

修 士 学 位 論 文

体外循環時における 超音波スペクトルピーク周波数を用いた赤血球凝集度測定

指導教授

渡部 泰明 教授

平成 2 9 年 2 月 1 7 日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 電気電子工学 専攻

学修番号 1 5 8 8 2 3 3 8

氏 名 渡 邊 祥

第 1 章. 序論	4
1.1. 背景.....	4
1.2. 血液粘度と赤血球凝集度	5
1.3. 本研究の位置づけ	5
第 2 章. 原理	6
2.1. 超音波による懸濁液の測定	6
2.2. アクリル粒子による赤血球の模擬	7
第 3 章. 方法	8
3.1. 試料作製	8
3.1.1. アクリル粒子溶液作製	9
3.1.2. 血液試料調整	12
3.2. 顕微鏡観察による凝集度評価	16
3.3. 超音波ピーク周波数スペクトル測定.....	18
3.3.1. 超音波の経路長の影響	20
3.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響	20
3.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響	21
3.3.4. ヘマトクリットの影響	21
第 4 章. 結果	22
4.1. 顕微鏡観察による凝集度評価	22
4.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価	22
4.1.2. 低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価	23
4.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	24
4.2.1. 超音波の経路長の影響	24
4.2.2. アクリル粒子凝集度の影響	25
4.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	26
4.3.1. 超音波の経路長の影響	26
4.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響	28
4.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響	30
4.3.4. ヘマトクリットの影響	31
4.3.5. 赤血球凝集度の影響	32

第 5 章. 考察	34
5.1. 顕微鏡観察による凝集度評価	34
5.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価	34
5.1.2. 低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価	34
5.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	34
5.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	35
5.3.1. 超音波の経路長の影響	35
5.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響	35
5.3.3. 時間経過による凝集の増進および粒子・赤血球の沈降の影響	35
5.3.4. ヘマトクリットの影響	36
5.3.5. 赤血球凝集度の影響	36
第 6 章. まとめ	37
今後の課題	37
参考文献	38
謝辞	40

第1章. 序論

1.1. 背景

血液粘度は糖尿病に代表される生活習慣病をはじめとした様々な疾患と関連の強い健康指標として注目されている。また、これを測定する方法としては健常者が日常的にセルフチェックを行えるような方法が理想である。このことから簡便に測定が可能であり、定量的であり、採血による身体的・経済的な負担や手間が少ない方法が求められている。このような条件から血液粘度測定において、超音波による非侵襲かつ定量的な測定手法に対する期待は大きい[1]~[7]。しかしながら、高濃度懸濁液中の粒子凝集度および全血中の赤血球凝集度の制御・確認の困難性から、これらを定量的に把握した上で超音波の応答を検討した先行研究は例が少ない[8]~[12]。そのため、目下の目標となるのは血液粘度と超音波測定によって得ることが可能な情報との関係の基礎的な調査である。したがって本研究では測定端子が直接血液に浸水した状態で測定を行うことを前提としたシステムを構築した。現状のシステムでは直ちに非侵襲な測定手法として臨床に応用することはできないが、臨床においてこのような制約条件下でも血液粘度測定が可能な機会が存在する。それは人工透析や人工心肺などに代表される体外循環治療時である。またこれらの治療が施される患者は血液粘度測定のニーズが高いことから体外循環治療時は超音波探触子浸水条件下での血液粘度測定の好機であると考えた。したがって本研究では体外循環治療時を前提とした超音波による血液粘度測定を目標とする。

非侵襲的な測定という観点からアプローチし、超音波による *in vivo* 計測を行う事で実際に皮膚越しに血液粘度を測定することを目標とした研究が行われている[13], [14]。しかしながらこれらの研究では血液粘度と超音波特性の定量性に関する基礎的な調査がなされていない。このことから本研究が目標とする血液粘度と超音波測定によって得ることが可能な情報との関係の基礎的な調査が必要であると考えられる。

超音波探触子浸水条件下での測定を前提とした場合、従来の血液粘度の測定手法として広く知られている Micro Channel array Flow Analyzer(MCFAN)を用いることや、振動式・回転式の粘度計によって粘度を測定する手法を用いることが可能となる。MCFAN による測定では毛細管内における血液流動性から血液粘度を測定するが、血液粘度上昇の主要因の一つである赤血球の凝集体は毛細血管内では破壊されることが知られている[15]。そのため MCFAN では毛細血管を想定した血液粘度測定を行うことができるが、大血

管内での血液粘度を正確に推定することはできていないと考えられる。

また、赤血球の凝集体は振動などによっても容易に破壊されることが知られている[15]。このことから従来の粘度測定手法も血液粘度上昇の主要因の一つである赤血球の凝集体に影響を与えてしまうため、大血管内を想定した血液粘度の測定には適さないと考えられる。

1.2. 血液粘度と赤血球凝集度

血液粘度と血液中の赤血球凝集度（赤血球凝集体の大きさ、および大きい凝集体の形成頻度）との間には強い相関関係があることが知られており、血液粘度を測定することを目的とした研究の多くがこの関係性に立脚している[8]~[12], [16]~[19]。本研究においてもこの関係性に着目し赤血球凝集度を測定することによって血液粘度を推定することを目標とした実験を行った。

1.3. 本研究の位置づけ

ヒトの血液は赤血球が体積密度（ヘマトクリット、以下 Hct）35~50%で血漿中に分散している状態の懸濁液であると考えられることができる。これまでの研究では凝集度の制御・確認および超音波による測定が容易である質量濃度5%程度の低濃度のアクリル粒子懸濁液を血液模擬試料として用いてきた[8], [9]。これは、赤血球の凝集度を制御・確認することが非常に困難であったことや、アクリル粒子の反射・散乱の強度が赤血球よりも強く超音波による測定手法の有効性を確認することが容易であると考えられたためである。しかしながら、この代替試料を用いた先行研究では全血における赤血球の状態と比較して粒子・赤血球の濃度が著しく異なることや、アクリル粒子と赤血球では反射・散乱の強度が異なることなどから、実際の血液に対して測定を行った場合の超音波による測定手法の有効性を十分に示せていなかった。このような問題点を解決するため本研究ではまず40%の高濃度のアクリル粒子溶液に対して超音波による凝集度測定を試みることで、高濃度の懸濁液中においても超音波測定手法が有効であることを確認する。続いてこの結果を用いて構成した実験系で赤血球凝集度を調整した実際の血液に対して超音波測定手法が有効であることを確認する。本研究ではヒトの血液との類似性、入手が容易な点、報告例が多いことなどの理由からブタ血液を使用して実験を行う。

第2章. 原理

2.1. 超音波による懸濁液の測定

超音波を溶液に対して照射し透過波を測定した場合、透過波では入射波から溶液中で減衰した成分を差し引いたものが測定される。溶媒中に粒子が分散している状態の溶液、すなわち懸濁液に超音波を照射した場合、超音波の減衰は主に粘性損失、熱的損失、散乱損失によって起こり、直径 $3\mu\text{m}$ 以上の粒子が分散している懸濁液においては散乱損失による減衰が支配的となることが知られている[18]~ [22]。

ヒトの場合赤血球は直径がおよそ $7\sim 8\mu\text{m}$ 、厚さが $2\mu\text{m}$ の円盤状であり、赤血球の凝集体は大きいもので数十 μm 程度である[23]。対して医療用として通常用いられる数 M~数十 MHz の超音波の波長はおよそ $75\sim 1000\mu\text{m}$ である。これらの赤血球および赤血球凝集体の径と超音波の波長の関係からここでの散乱損失による減衰は Rayleigh 散乱によるものが支配的となる[24], [25]。Rayleigh 散乱が支配的となる条件下では粒子や凝集体の径が大きくなるほど高周波の減衰が大きくなり、結果として超音波スペクトル上においてピークとなる周波数が低下する。

本研究ではこれを利用することで超音波スペクトルピーク周波数を測定し、アクリル粒子径およびアクリル粒子・赤血球の凝集度を測定することを目指す。

2.2. アクリル粒子による赤血球の模擬

本研究では溶液中の粒子の粒径および粒子の凝集度とピーク周波数との関係を調査するため、径が既知であるアクリル粒子を用いて以下の方法で赤血球凝集体を模擬する。図 2.1 のように赤血球に近いサイズのアクリル粒子の溶液に凝集作用のある薬剤を投入し実際にアクリル粒子の凝集体を形成することで赤血球凝集体を模擬する方法である。ここではヒトの赤血球の直径約 $7\sim 8\mu\text{m}$ に近い $6.5\mu\text{m}\phi$ のアクリル粒子懸濁液に凝集剤を加えることでアクリル凝集体懸濁液を作製する。これを用いることで様々な凝集径や複雑な形状を持つことが予想される赤血球の凝集体をより正確に模擬することが可能である。

先行研究では図 2.2 のようにひとつひとつの凝集体を超音波に対して等価な球相当径を持った一つの大きな粒子であると考えて $6.5\sim 110\mu\text{m}\phi$ の大小のアクリル粒子を用いて赤血球凝集体を模擬する方法も用いていたが、本研究では図 2.1 の様な方法を用いることで様々な凝集径や形状を持つ赤血球凝集体をより正確に赤血球の凝集体を模擬する。

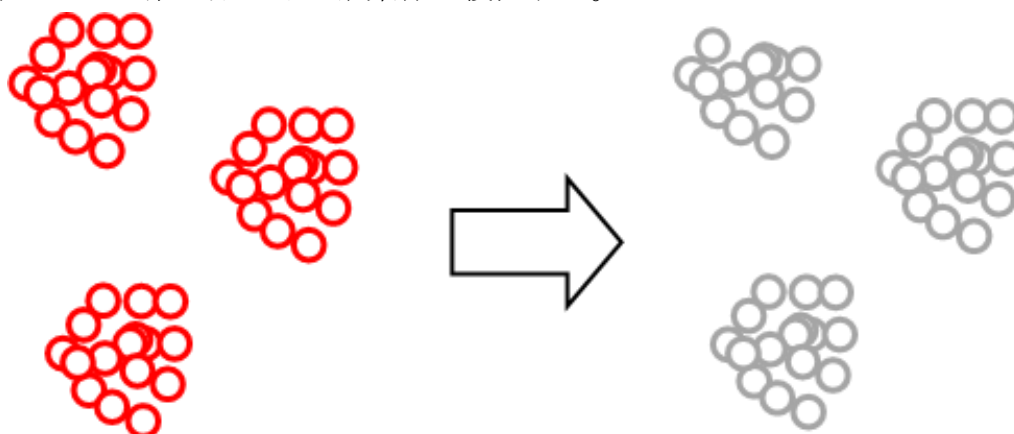


図 2.1 小径アクリル粒子＋凝集剤溶液による赤血球凝集体の模擬

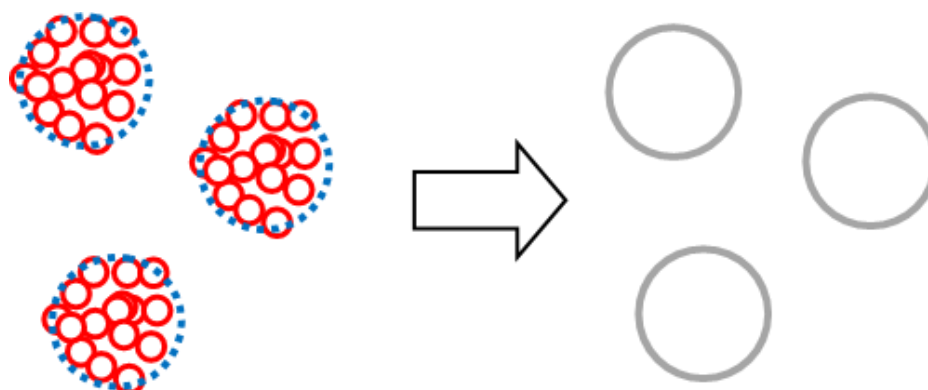


図 2.2 大径アクリル粒子による赤血球凝集体の模擬

第3章. 方法

3.1. 試料作製

本研究ではアクリル粒子サンプルおよび豚血液サンプルを作製する。以下の表 3.1 に示す薬品・試料、および機器を使用し、サンプルを作製する。

表 3.1 使用する薬品および試料、機器

名	製造社名	品名・型番
アクリル粒子	根上工業	アートパール GR-800(6.5 μ m ϕ)
豚血液	芝浦臓器	抗凝固剤(クエン酸ナトリウム水溶液)入り
クールインキュベータ	MEE	CN-40A
電子天秤	AND	EK-410i
カルボキシメチルセルロース(CMC)	関東化学株式会社	
アロンフロック	MT アクリルポリマー(株)	C-510
デキストラン 70	TCI	
真空ポンプ	ULVAC	DA-20D
遠心分離機	AS ONE	CN-2060
ヘマトクリット遠心機	株式会社コクサン	H-1200C

本研究では超音波測定を目的とした実際の血液に近い状態の Hct=40%付近の血液サンプルおよびそれを模擬した質量濃度 40%の高濃度のアクリル凝集体懸濁液（小粒径アクリル粒子＋凝集剤溶液）、顕微鏡観察により凝集剤の凝集作用を確認するための Hct=5%に調整した血液サンプルおよび質量濃度 5%の低濃度の小粒径アクリル凝集体懸濁液の 4 パターンのサンプルを作製する。

本研究では粉末状態のアクリル粒子の体積を正確に測定することが困難であることからアクリル粒子溶液の調整には質量濃度を用いるが、血液中の赤血球と血漿の比を表わす Hct は体積分率である。アクリルの比重が約 1.19~1.40 であることから、質量濃度を用いてアクリル粒子溶液を作製すると体積分率は質量濃度より小さくなると考えられる。

3.1.1. アクリル粒子溶液作製

上記の通りアクリルの比重は約 1.19~1.40 と水や生理食塩水などより比重が大きいため、単にアクリル粒子と溶媒となる水などと混合すると沈殿し堆積してしまう。粒子が分散状態にない場合、本研究で行う顕微鏡観察および超音波測定いずれの実験においても粒子や凝集体ひとつひとつを正確に捉え測定することが困難となる。そのため本研究では水にカルボキシルメチルセルロース（以下 CMC）を重量比で 1%混合し、粘度を高めた CMC 溶液を溶媒として用いることでアクリル粒子の沈殿を防ぐ。

またアクリル粒子と CMC1.0%溶液を混合する際多くの気泡が混入してしまうが、溶液への気泡の混入は超音波測定において大きな誤差の要因となりうる。そのため本研究ではサンプル作製後真空ポンプを用いて脱気することで溶液サンプル中の気泡を取り除く。

凝集剤にはアロンフロック C510 を用いる。本来の用途は下水や産業排水中の汚泥の処理であるが、非常に低濃度でアクリル粒子溶液に混入することでアクリル粒子に対して凝集作用を持つことが知られている。本研究では 0.1%に調整したアロンフロック C510 水溶液を凝集剤溶液としてアクリル粒子溶液に投入しアクリル凝集径の従量制御を行う。

アクリル粒子は人の赤血球と近いサイズを持つ $6.5\mu\text{m}\phi$ のものを使用する。

アクリル粒子を使用する 2 種類のサンプルはそれぞれ以下の方法で作製する。

- ・ 顕微鏡観察用小粒径アクリル+凝集剤による模擬赤血球凝集体溶液
 $6.5\mu\text{m}\phi$ のアクリル粒子が質量比で 5%、アロンフロック C510 の 0.1%水溶液が 0~15%となるように CMC1.0%水溶液の量を調整し混合する。
- ・ 高濃度小径アクリル粒子+凝集剤による模擬赤血球凝集体溶液
 $6.5\mu\text{m}\phi$ のアクリル粒子が質量比で 40%、アロンフロック C510 の 0.1%水溶液が 0~15%となるように CMC1.0%水溶液の量を調整し混合する。

分量などを含めた具体的なそれぞれのサンプルの作製フローは次ページ以降図 3.1、図 3.2 のようになる。

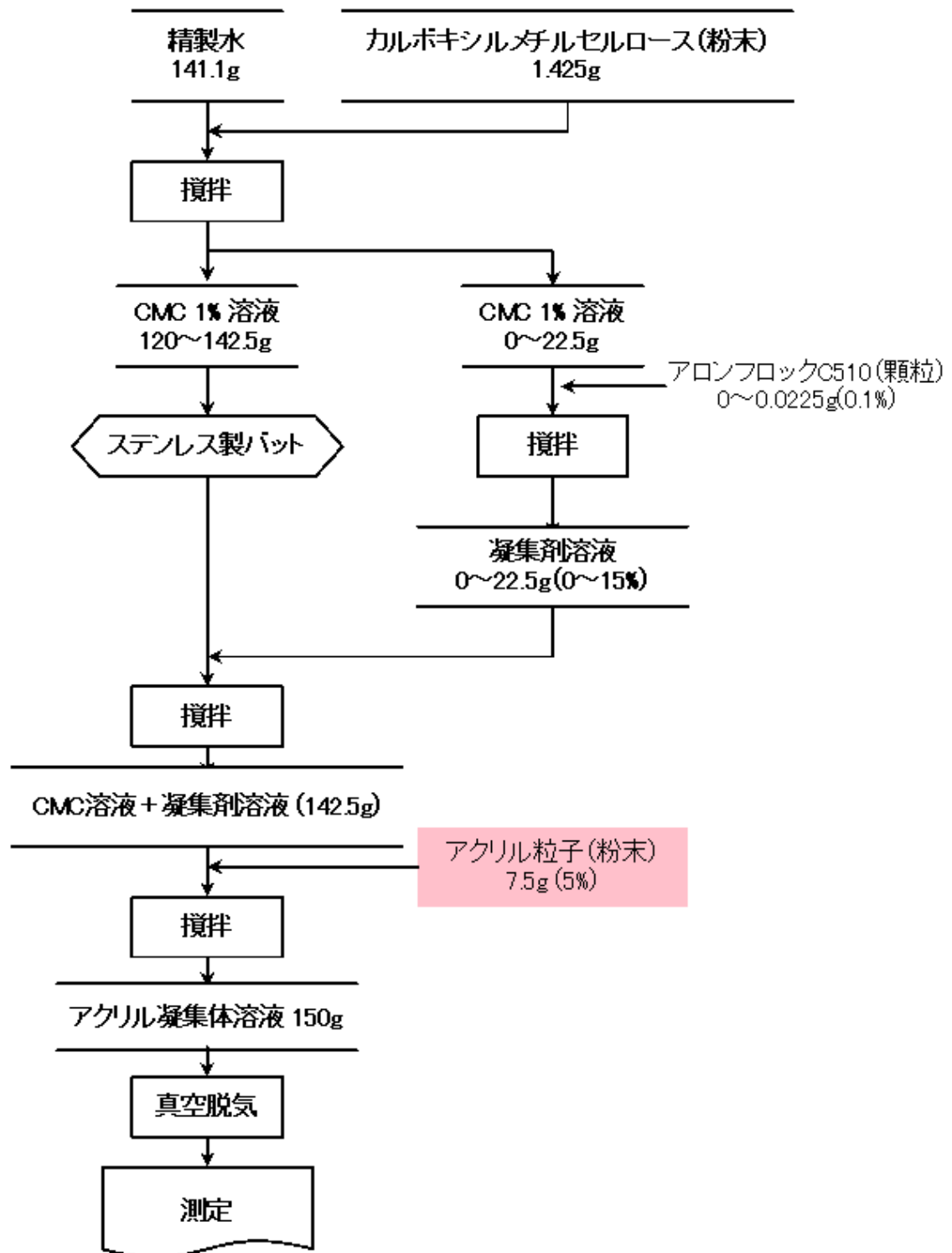


図 3.1 低濃度 $6.5\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子+凝集剤による赤血球凝集体模擬試料の調整手順

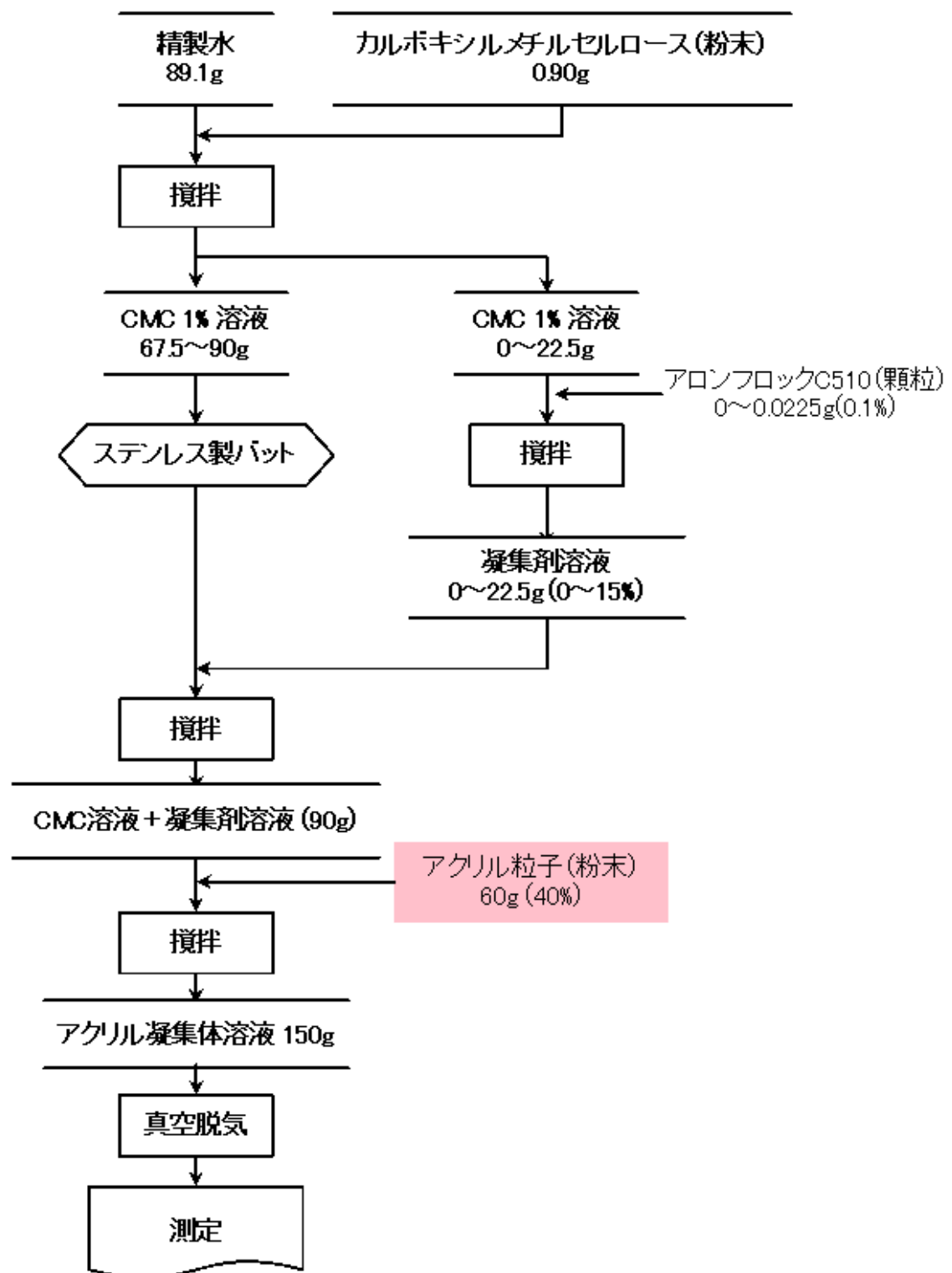


図 3.2 高濃度 6.5 $\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子+凝集剤による赤血球凝集体模擬試料の調整手順

3.1.2.血液試料調整

赤血球を凝集させる作用が知られている物質にはポリブレン、レクチン、デキストランなどがあるが[15], [26]~[28]、本研究では分子量が 70kDa のデキストラン 70 を用いる。デキストラン 70 は粉上の物質であり、全血に直接デキストラン 70 を投与すると溶け残りができ易くなってしまう。このため本研究では生理食塩水に 10wt%でデキストラン 70 を加えたデキストラン 70-10%水溶液を作製しこれを血液に混入する。

本研究では入手が比較的容易であり報告例も多い豚の血液を用いて実験を行うが、豚の健康状態など豚の個体差によって Hct や赤血球凝集度に影響を与える血漿中のタンパク質の濃度などに差が出ると考えられる。複数のブタから採血した血液を用いた実験においてこれによって生じる誤差を抑えるため本研究では洗浄赤血球を生理食塩水と所望の Hct となるよう混合したものを血液サンプルとして使用する。

洗浄赤血球は以下のような方法で作製する。まず全血を遠心分離により血球成分と血漿成分を分離したものから血漿成分を取り除く。続いて取り除いた血漿と同量の生理食塩水を加え攪拌したのち、再び遠心分離を行う。その後再び血球以外の成分を取り除いたものを洗浄赤血球として実験を行う。ここで行う遠心分離は遠心分離機 CN-2060 を用いて回転数 3,000rpm で 10 分間の条件で行う。

作製した洗浄赤血球は少量の生理食塩水と混合したのち Hct を測定する。Hct は測定専用の毛細管および遠心機を用いてブタ血液原試料の Hct を測定する。ブタ血液を毛細管内に封入し、これを Hct 測定時の標準的な条件である 12,000r.p.m.で 5 分間遠心処理する。ここで用いるのはヘマトクリット遠心機 H-1200C である。遠心処理後、血球成分と生理食塩水成分に分離した毛細管内の血液に対して測定用スケールを用いることで Hct を測定することが可能である。

2 種類のサンプルはそれぞれ以下の方法で作製する

- ・低濃度血液サンプル

低濃度の血液サンプルの場合洗浄赤血球を用いると凝集剤投入後も赤血球の凝集の増大が観察されなかった。Hct=5%の場合 Hct=40%の場合と比べて赤血球の数が著しく少ないため、赤血球同士の接近・接触の機会が非常に少なくなり、赤血球凝集の形成頻度も低くなると考えられる。洗浄赤血球ではなく入手した血液試料をそのまま生理食塩水で Hct=5%に調整した場合、Hct=5%でもデキストランの投入によって凝集度を調整

することができたが、これは自己血漿中に含まれるアルブミン、グロブリン、フィブリノゲンなどのタンパク質成分が凝集に対して作用したためと考えられる[15], [26]~[28]。洗浄赤血球を用いるのはこれらのタンパク質成分による差異を減少させるためであるが、本項ではデキストランの投入による赤血球凝集度の従量制御の可能性を調査することが目的であるため、自己血漿を含む全血を生理食塩水の混合によって以下の様に調整した血液試料を用いる。

測定した元の血液試料の Hct に基づいて、Hct=5.0%、デキストラン 70 の濃度が 0~2.5%となるようにデキストラン 70-10%水溶液および生理食塩水の量を調整し混合する。

- ・ 高濃度血液サンプル

洗浄赤血球作製後に測定した Hct に基づいて、Hct=30~50%、デキストラン 70 の濃度が 0~2.0%となるようにデキストラン 70-10%水溶液および生理食塩水の量を調整し混合する。

分量などを含めた具体的なそれぞれのサンプルの作製フローは次ページ以降図 3.3、図 3.4、図 3.5 のようになる。

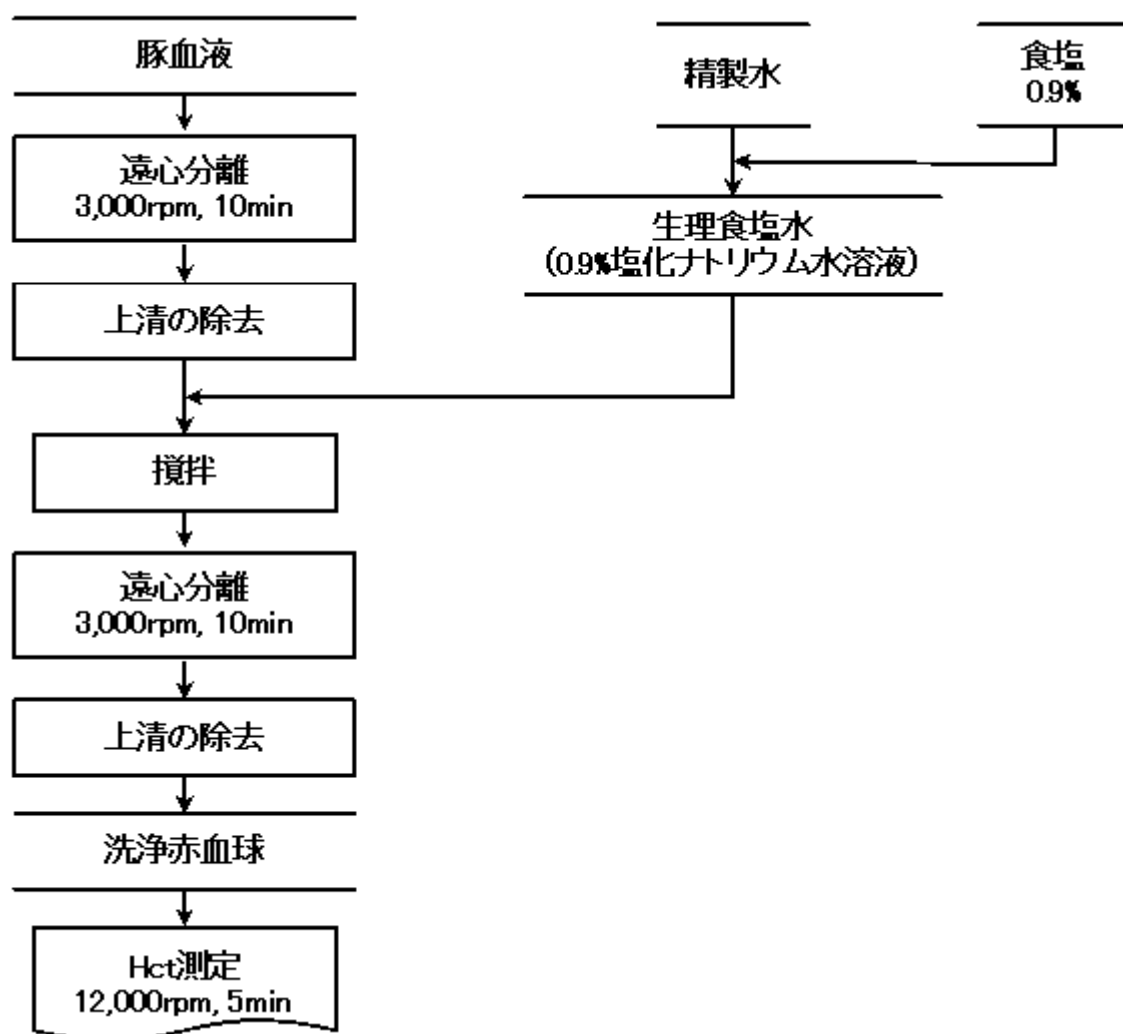


図 3.3 洗浄赤血球の作製手順

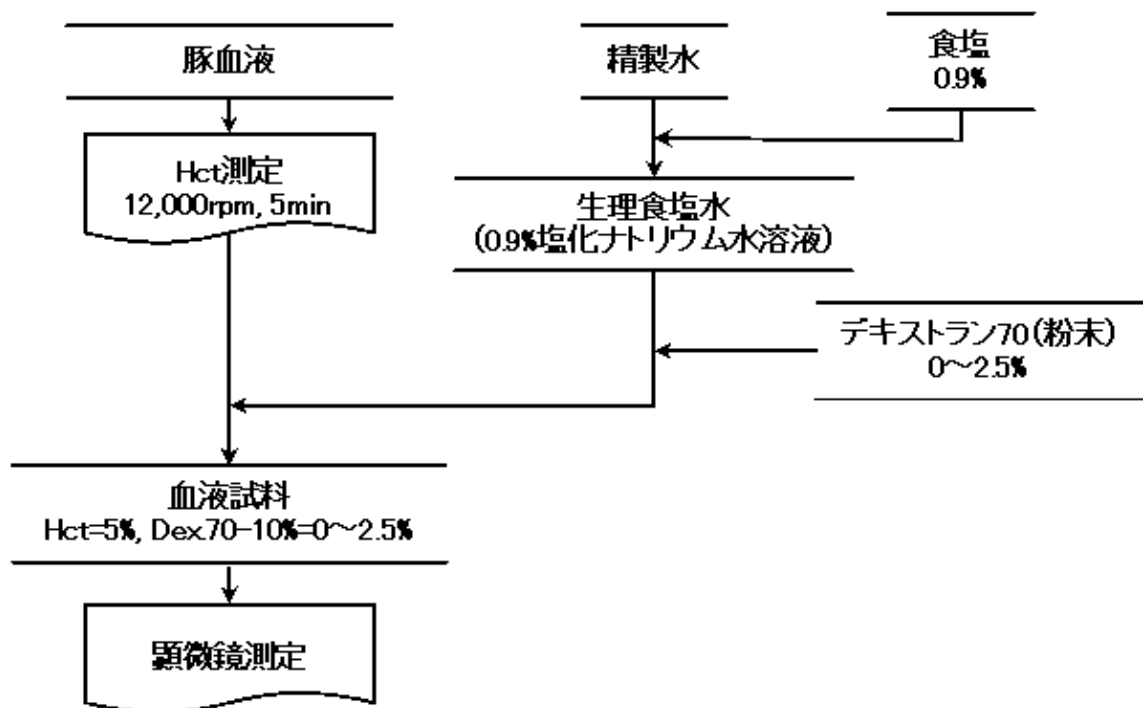


図 3.4 低濃度血液試料の調整手順

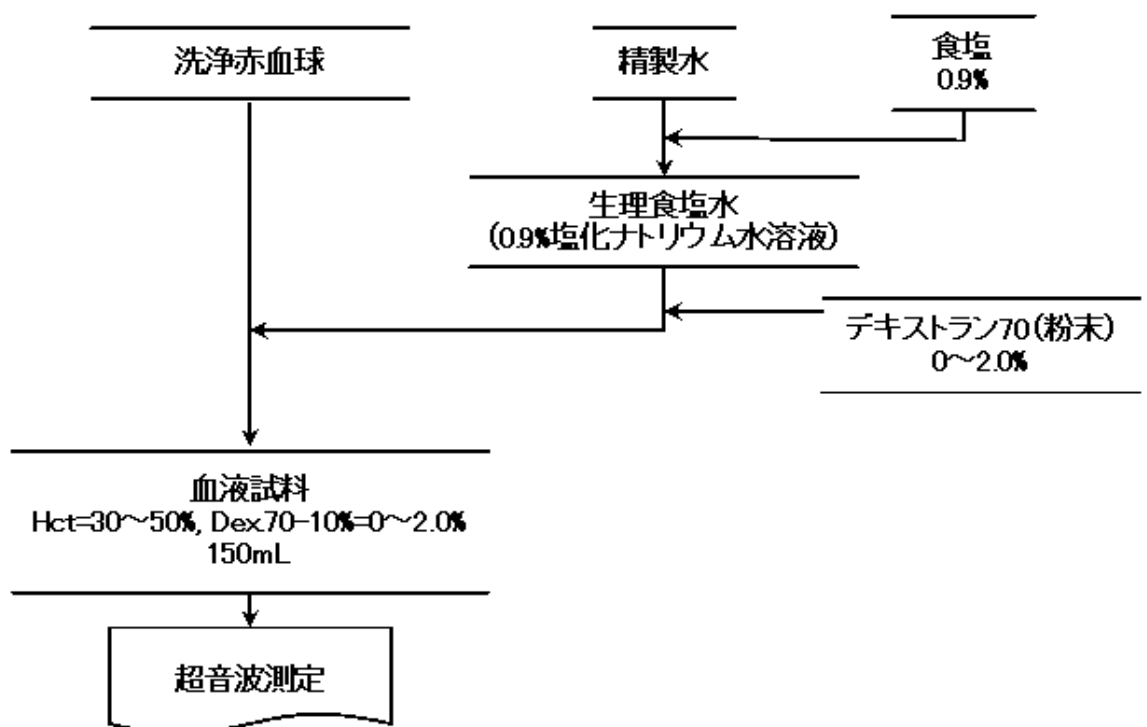


図 3.5 高濃度血液試料の調整手順

3.2. 顕微鏡観察による凝集度評価

赤血球およびアクリル粒子の凝集体は複雑な形状を持つことが顕微鏡観察によって確認されている。本研究では以下の図 3.6 のような方法で凝集体を楕円に近似しその短径と長径の平均を 1 つの凝集体の平均径とする。

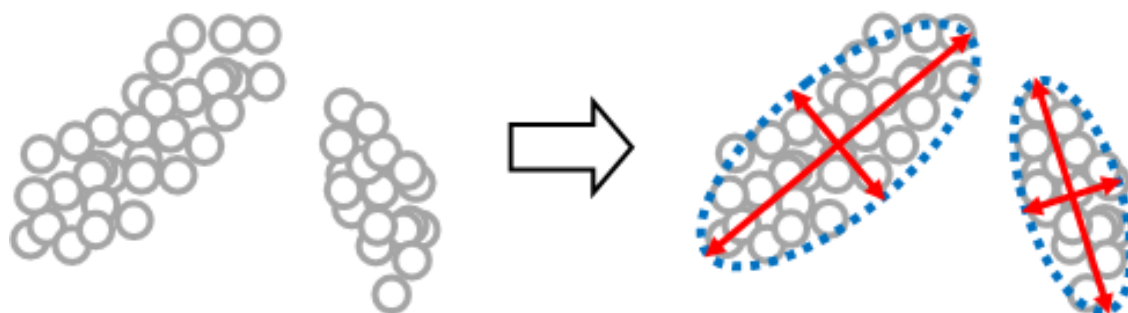


図 3.6 楕円による凝集体の近似および凝集径の決定

本研究ではアロンブロック C510 のアクリル粒子に対する凝集作用、デキストラン 70 の赤血球に対する凝集作用を確認するため、それぞれ粒子の質量濃度 5%、Hct=5%に調整したサンプルを用いて平均凝集径測定を行う。実際の血液の Hct は 40%前後であるが、高濃度の懸濁液においては光学顕微鏡を用いた測定の際粒子同士が奥行き方向に重なってしまうことや、粒子同士が密着していることによって個々の凝集体サイズの正確な測定が困難となる。そのため本研究では 5%の低濃度に調整したサンプルを用いてアロンブロック C510、デキストラン 70 それぞれの凝集作用を確認する。

溶液を超音波測定と同様の深さのあるバットなどに入れた状態では観察できないため、スライドガラスなどに薄く広げる必要がある。この際、凝集体は図 3.7 のように横に広がる方向に配向することが考えられ、光学的観察による測定結果が実際の平均の径より大きく見積もられる可能性がある。しかしながらこのような条件下においても凝集剤の混合比率によって平均の凝集径が増大し、それに応じた超音波ピーク周波数の特性を調査するという本研究の目的は達成することが可能である。

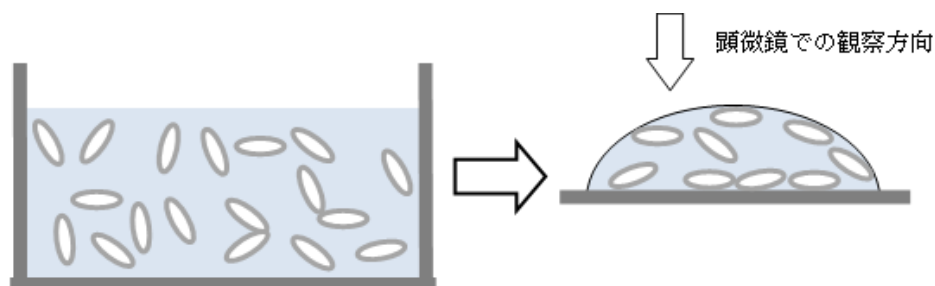


図 3.7 顕微鏡観察方向に対する凝集体の配傾

本研究では以下の表 3.2 の機器を用いて凝集径の測定を行う。300 以上の粒子・凝集体を室温 23℃で計測し、平均凝集径を求めた。

表 3.2 使用する機器

機器・ソフト名	製造社名	品名・型番・性能等
光学顕微鏡	KEYENCE	VHX-1000
Image J	National Institutes of Health	

3.3. 超音波ピーク周波数スペクトル測定

本研究では以下の図 3.8 のような実験機器構成で超音波ピーク周波数スペクトルを測定していく、

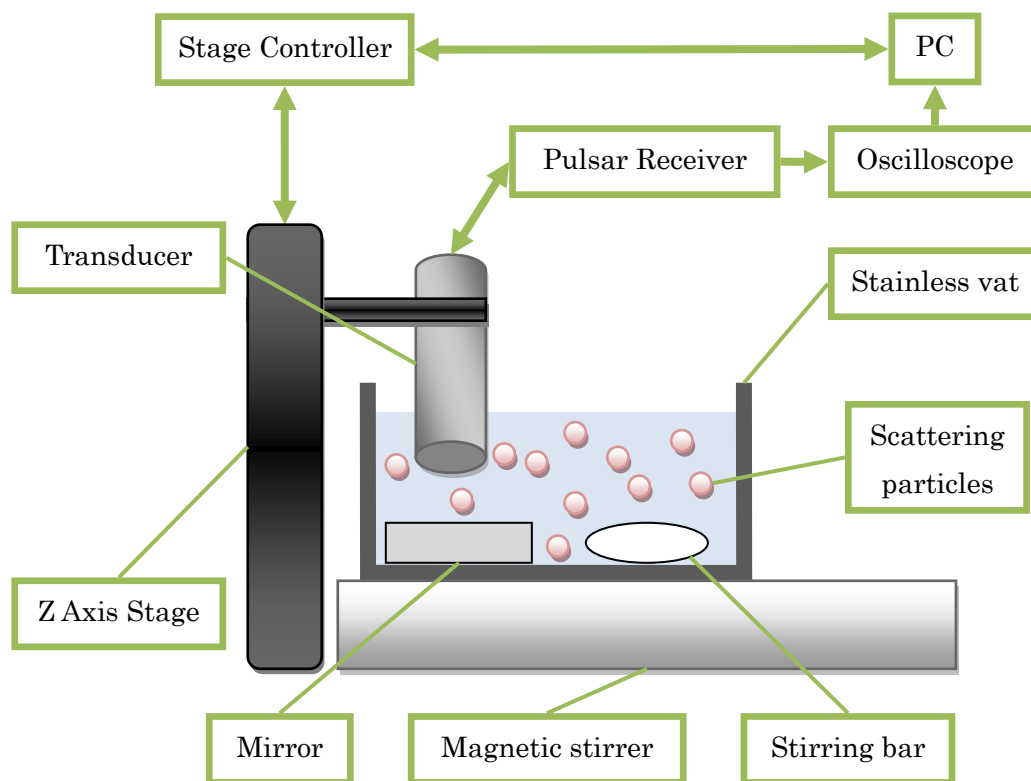


図 3.8 実験機器構成図

以上の実験システムで使用する実験機器は以下の表 3.3 のとおりである。

表 3.3 使用する実験機器

機器名	製造社名	品名・型番
トランスデューサ	Olympus	V-316-SU
オシロスコープ	Agilent Technologies	DSO1014A
パルサーレシーバ	OLYMPUS	5073PR
マグネチックスターラ	ASONE	HS-1DN
クールインキュベータ	MEE	CN-40A
自動ステージ	シグマ光機	SGSP20-20(X), SGSP20-20(Z)
2軸ステージコントローラ	シグマ光機	SHOT-102
ステンレス製バット	赤川器物製作所	L105×W68×H59[mm], 0.3L
ラボラン回転子	ASONE	30×φ8, PTFE 製

以上のような測定系で測定試料に対して超音波測定を行う際、粒子・赤血球の凝集度以外にピーク周波数に影響を与えると考えられるパラメータは超音波の経路長、攪拌、粒子濃度の3つである。凝集度—ピーク周波数間の関係性を明らかにするため、まずこれらのパラメータのピーク周波数への影響を以下の実験を行うことで調査する。実験は 37℃に調整したクールインキュベータ CN-40A 内で行う。

3.3.1.超音波の経路長の影響

超音波が溶液に入射してから反射板で反射して受信するまでの距離、すなわち超音波の経路長が変化することによって超音波の経路中に含まれる粒子数が大きく変化する。本研究で測定するピーク周波数のシフトは超音波経路中の粒子による散乱に基づいているため、超音波の経路長はピーク周波数に大きく影響することが予想される。したがって本研究では以下のような実験を行うことによってこの影響を調査する。

本研究で構成した実験系ではトランスデューサを Z 軸ステージに固定しており、トランスデューサー反射板間の距離を任意に設定することができる。本研究では超音波の経路長をアクリル試料の場合は 2~20mm の範囲を 1.0mm 間隔で、血液試料の場合は 10mm~30mm の範囲を 1.0mm 間隔で変化させながら実験を行い、超音波の経路長のピーク周波数に与える影響を調査する。ここでは凝集径が最小になると考えられる凝集剤を投入しない血液試料と凝集径が最大になると考えられる凝集剤濃度で投入したアクリル試料・血液試料に対してピーク周波数測定を行い、超音波の経路長の適切な設定値を探索する実験を行う。

3.3.2.マグネチックスターラによる攪拌の影響

攪拌には以下の目的がある。

1 つ目は試料の作製段階において凝集剤溶液や粒子、赤血球と溶媒を均一に混合するためであり、アクリル粒子試料・血液試料いずれの場合においても試料作製段階で攪拌を行う必要がある。

2 つ目は超音波測定中に粒子および赤血球が沈降することを防ぐためである。アクリル粒子試料の場合、CMC によって溶媒の粘度を高めたとしても沈降を完全に防ぐことはできないため、攪拌を行うことが必要である。アクリル粒子の沈降を防ぐためには本研究の実験で用いたステンレス容器や回転子などの環境下では 360rpm 程度の攪拌が必要であった。また、アロンブロック C510 の凝集作用によるアクリル粒子の凝集現象はこの攪拌によって破壊されない強度を持つ。

対して、血液試料の場合、赤血球の比重が血漿や生理食塩水に近い場合、超音波測定の実験を行う間に起こる沈降は小さく攪拌を行うことは必須ではない。赤血球の沈降を完全に防ぐためには本研究の実験環境下で 300rpm 程度の攪拌が必要であったが、赤血球の凝集体は血液の流れや攪拌などで容易に破壊されることが知られている[15]。そのため本項では血

液試料に対して攪拌をした場合としない場合において行い、攪拌のピーク周波数に対する影響を調査する。

また 3.3.3. では攪拌を行わない場合、超音波測定に影響を与える赤血球の沈降が起こるかどうかを調査する。

このほかにも攪拌を行うことで溶液に流れが生まれるため、ドップラーシフトによるピーク周波数の変化が起こる可能性がある。しかしながら水中での音速が約 1500m/s であるのに対し、本研究で行う 300rpm 程度の攪拌で起こる流速は回転数と回転子のサイズから~500mm/s 程度であると考えられる。この予想される流速が水中での音速と比較して非常に小さいため本研究の実験環境下では攪拌によるドップラーシフトは考慮する必要がないと考えられる。

3.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響

3.3.1. 章の実験で超音波の経路長を変化させながら測定を行う場合、10mm と 40mm ではおよそ 60min の時間差が生じてしまう。この際、攪拌を行わないと前項で述べた赤血球の沈降、および凝集体形成の増進が起こる可能性がある。そのため攪拌しない場合において、時間経過に応じて超音波の経路長が大きくなる場合と時間経過に応じて超音波の経路長が小さくなる場合の双方において実験を行い比較することによって、赤血球の沈降および時間経過による赤血球凝集体形成の増進の影響を調査する。

アクリル粒子試料の場合は攪拌を行わないと、即座にアクリル粒子が沈降してしまい超音波測定を正確に行うことができないこと、およびアロンブロック C510 の凝集作用が強いためアクリル凝集体が攪拌で破壊されないことから本項の実験は行わない。

3.3.4. ヘマトクリットの影響

ヘマトクリットはヒトの場合健常者でも、男性 : Hct=40.8~49.6%, 女性 : Hct=34.0~45.3%と個体差のある値をとることが知られている[29]。Hct が変化することにより超音波の経路中に含まれる粒子数が変化するため、Hct もまたピーク周波数に影響を与えるパラメータであると予想される。本研究では Hct を 30,40,50%の 3 つの値に設定し、Hct のピーク周波数に与える影響を調査する。本項では Hct による影響を調査するためデキストラン 70 溶液は投入しない。

第4章. 結果

4.1. 顕微鏡観察による凝集度評価

4.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価

低濃度 6.5 $\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子+凝集剤による赤血球凝集体模擬試料に対して、光学顕微鏡を用いた凝集径の測定を行った。

アクリル粒子濃度 5%、アロンフロック 0.1%溶液濃度 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%における凝集径の測定結果を以下の図 4.1 に示す。

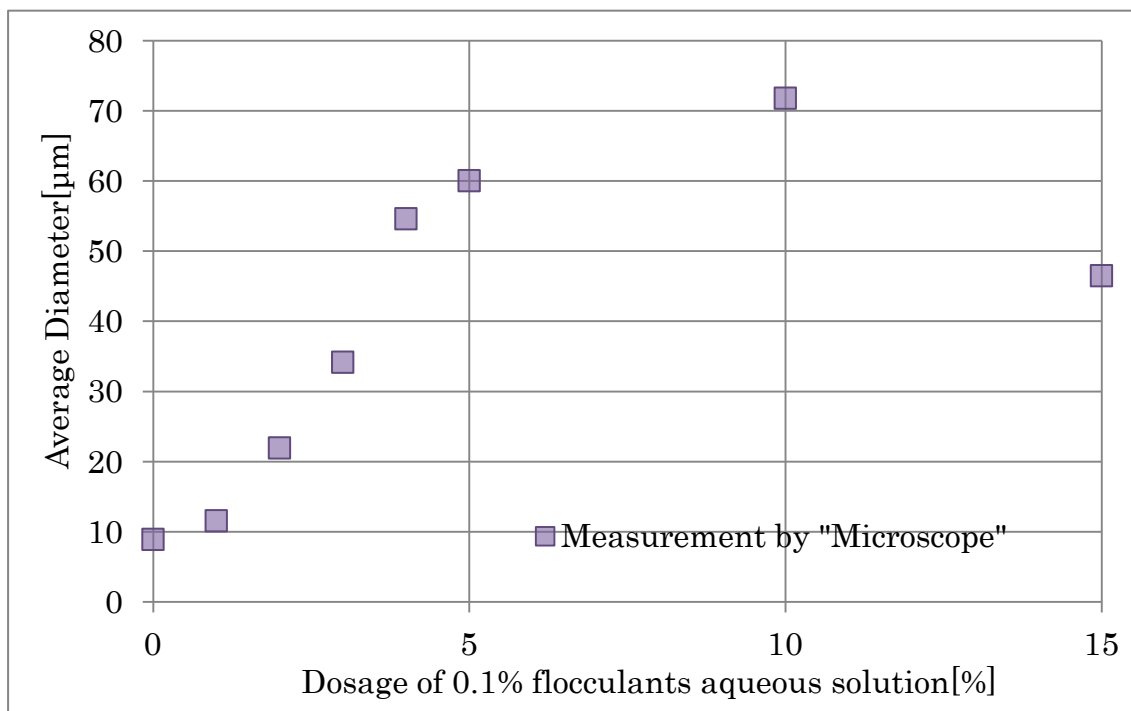


図 4.1 凝集剤 C510 投入によるアクリル凝集体平均径の変化

以上の結果から凝集剤濃度 10%まででは凝集剤の投入量によってアクリル凝集体の平均凝集径が大きくなり、10%よりも多く凝集剤を投入してもアクリル凝集体の平均凝集径はそれ以上大きくならないことが分かった。

4.1.2.低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価

低濃度血液試料に対して光学顕微鏡を用いた赤血球凝集径の測定を行った。

Hct=5.0%、デキストラン 70 濃度 1%, 1.5%, 2%, 2.5% の場合の凝集径の顕微鏡観察による測定結果を以下の図 4.2 に示す。

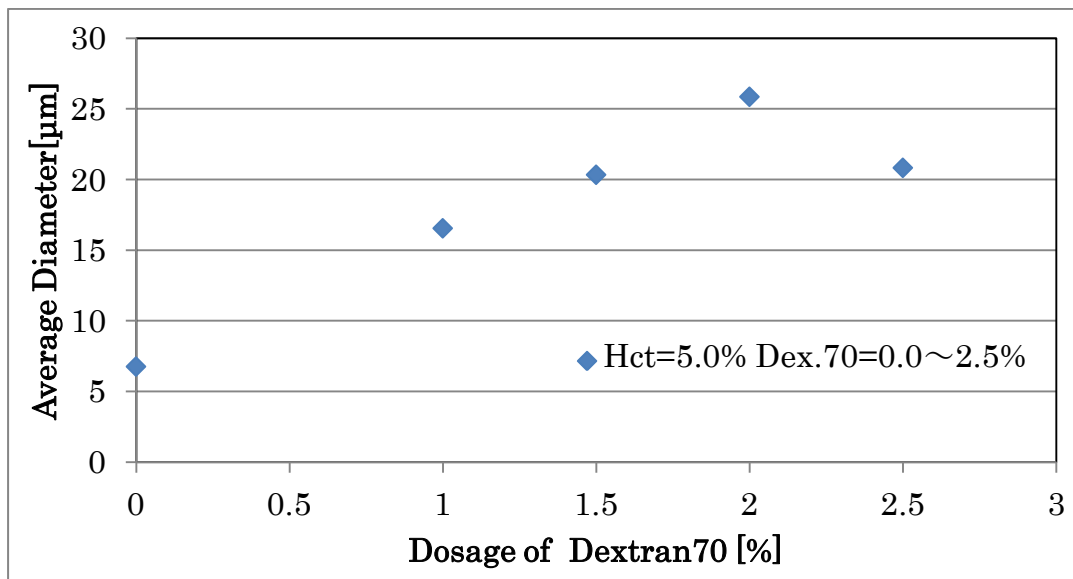


図 4.2 デキストラン 70 投入による赤血球凝集体平均径の変化

以上の結果からデキストラン 70 濃度が 2% までの場合はデキストランの投入量によって赤血球の平均凝集径が増加し、それ以降は赤血球の平均凝集径が低くなることが分かった。本研究では赤血球凝集度に応じたピーク周波数の特性を調査することが目的であるため、以降の実験はデキストラン 70 濃度が 2.0% までの範囲で行う。

4.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

4.2.1. 超音波の経路長の影響

CMC1.0%水溶液、および $6.5\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子溶液に凝集剤アロンフロック C510-0.1%水溶液を 0,3,5,10,15%で投入した試料に対して、超音波の経路長を 2~20mm の範囲で変化させながら超音波ピーク周波数の測定を行った結果を以下の図 4.3 に示す。本項では超音波の経路長がピーク周波数に影響を与えることの確認、および大まかに適切な超音波の経路長を探索することが目的であるため、超音波の経路長の探索の間隔は適宜設定した。

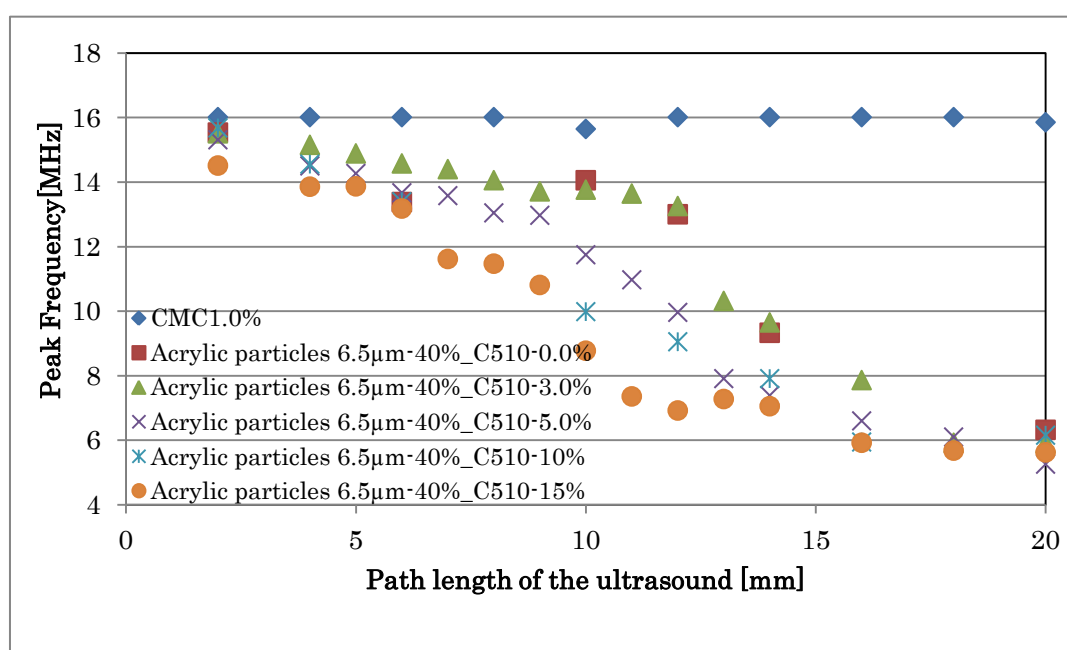


図 4.3 アクリル粒子懸濁液中でのピーク周波数測定における超音波経路長の影響

以上の結果から超音波の経路長が 6mm より小さい場合はいずれの試料でも差が得られなかった。また超音波の経路長が 16mm より大きい場合も試料による差が得られなかった。

また、この結果から C510-0.1%水溶液濃度が 0%の場合と 15%の場合でピーク周波数の差が最大となった超音波の経路長を 12mm とするのが本研究の実験系における超音波の経路長の適切な設定値であると考えられる。

4.2.2. アクリル粒子凝集度の影響

4.2.1. 項の実験結果より超音波の経路長を 12mm とした場合の C510-0.1%水溶液濃度とピーク周波数との関係を以下の図 4.4 に示す。

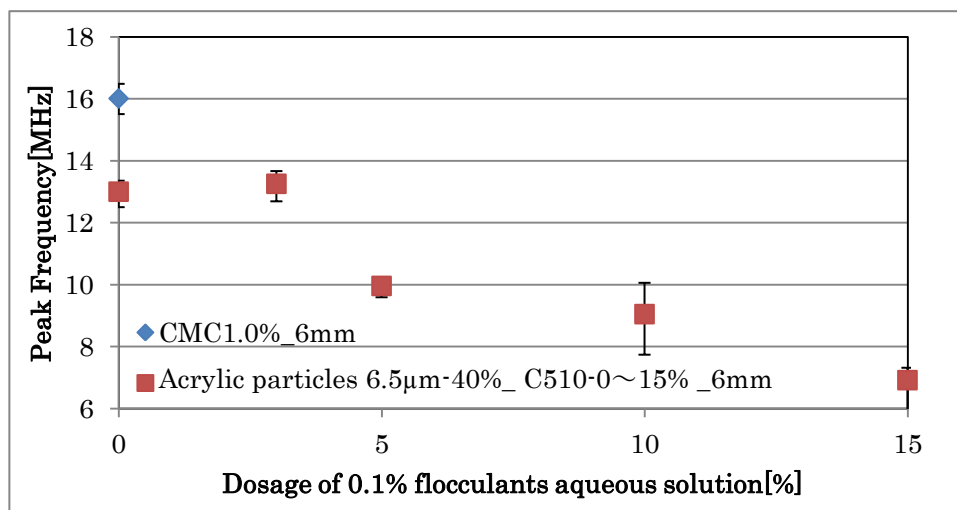


図 4.4 アクリル粒子懸濁液中での凝集剤投入量とピーク周波数の関係

また、4.1.1.項で測定した各 C510-0.1%水溶液濃度におけるアクリル凝集体の平均の凝集径とピーク周波数の関係を以下の図 4.5 に示す。

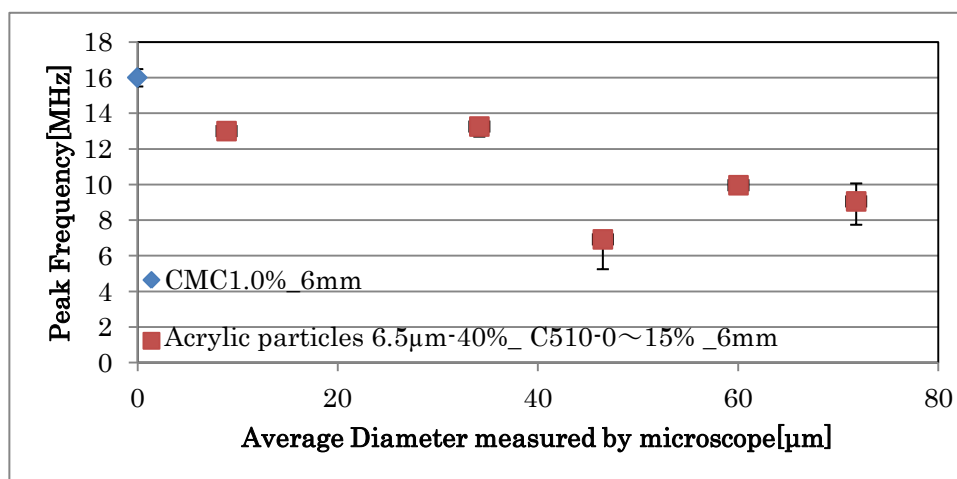


図 4.5 アクリル粒子懸濁液中での平均凝集径とピーク周波数の関係

これらの結果から高濃度アクリル懸濁液に対しても、ピーク周波数による凝集度測定の可能性が示された。

4.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

4.3.1. 超音波の経路長の影響

実験系の安定性や超音波ピーク周波数測定時に懸濁液の分散溶媒となる生理食塩水に対する特性を把握するため、生理食塩水に対して超音波の経路長を変化させながら超音波ピーク周波数の測定を行った。この結果を以下の図 4.6 に示す。

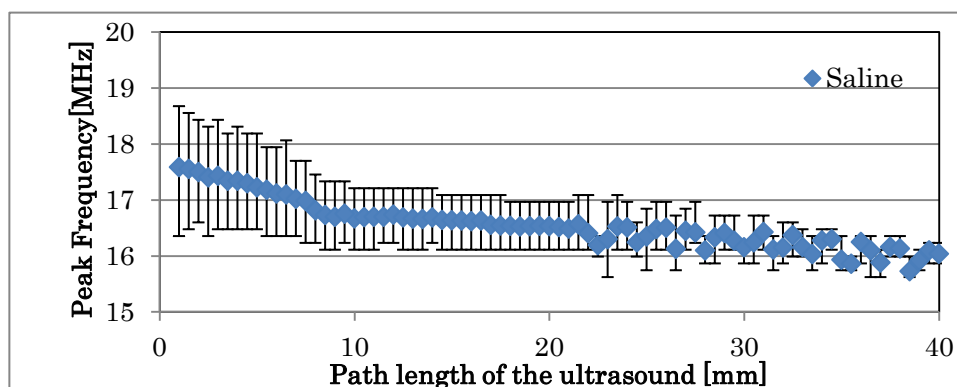


図 4.6 生理食塩水中でのピーク周波数測定における超音波経路長の影響

以上の結果から超音波の経路長が 10mm より小さい場合にピーク周波数が急激に変化していること、21mm よりも大きい範囲で測定結果の安定性が低くなることがわかる。この結果から以降行う血液サンプルに対する超音波測定は 10mm~20mm の範囲で行うのが適切であると考えられる。

以上の結果に Hct=40%, Dex70 濃度 0%、Hct=40%, Dex70 濃度 2.0%の血液試料に対するピーク周波数の測定結果を加えると以下の図 4.7 様になる。

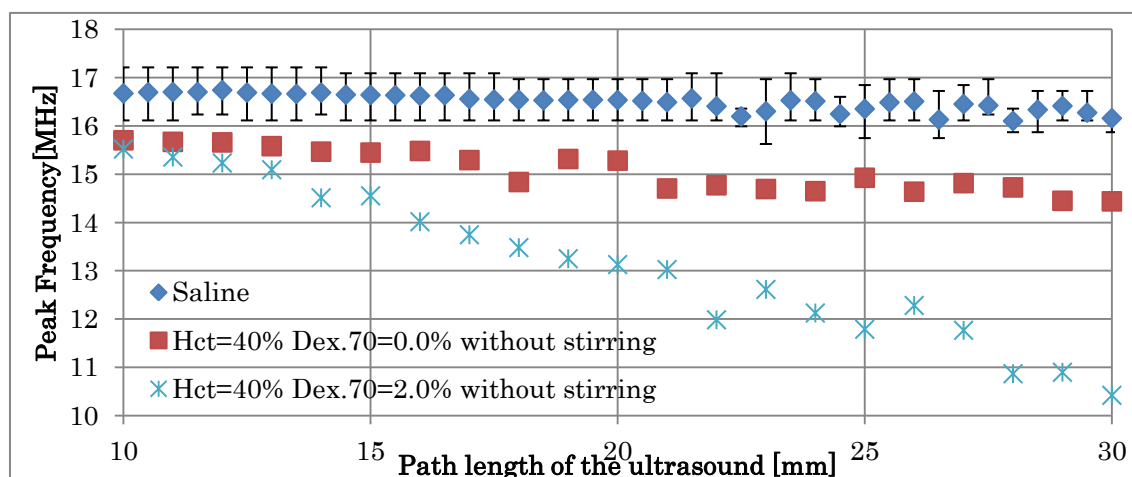


図 4.7 血液試料中でのピーク周波数測定における超音波経路長の影響

図 4.1 の生理食塩水に対する測定結果から超音波の経路長を 10mm~20mm の範囲に設定するのが適切であると考えられることから、Hct=40%, Dex70 濃度 0%の血液試料と Hct=40%, Dex70 濃度 2.0%の血液試料とのピーク周波数の差を 10mm~20mm の範囲で以下の図 4.8 に示す。

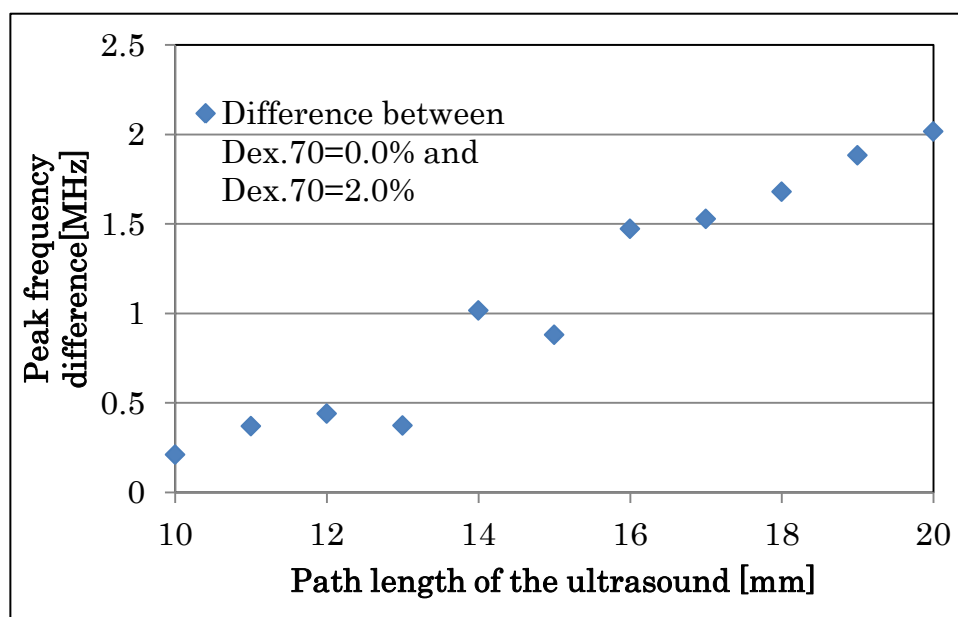


図 4.8 Dex70 濃度 0%および Dex70 濃度 2.0%の血液試料におけるピーク周波数の差異

この結果から、超音波の経路長を 20mm とすることによって最大のピーク周波数差を得ることができることが分かった。

4.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響

Hct=40%に調整した血液試料に Dex70-10%水溶液を Dex70 濃度が 1.0%,1.5%,2.0%となるように投入したサンプルにおいて、300rpm で攪拌した場合と攪拌を行わなかった場合の超音波経路長 10~30mm におけるピーク周波数の測定結果を以下の図 4.9、図 4.10、図 4.11 に示す。

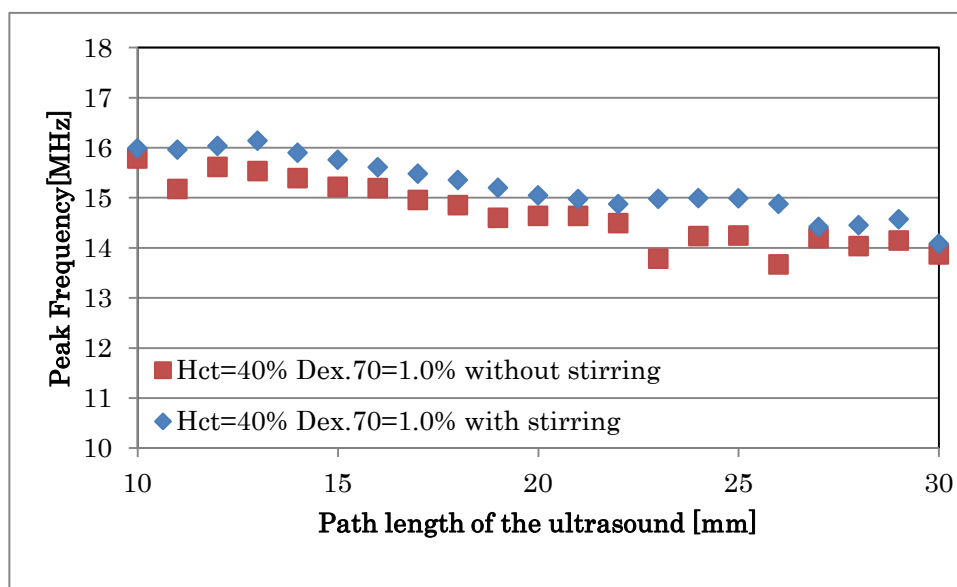


図 4.9 Hct=40%, Dex70=1.0%における攪拌の影響

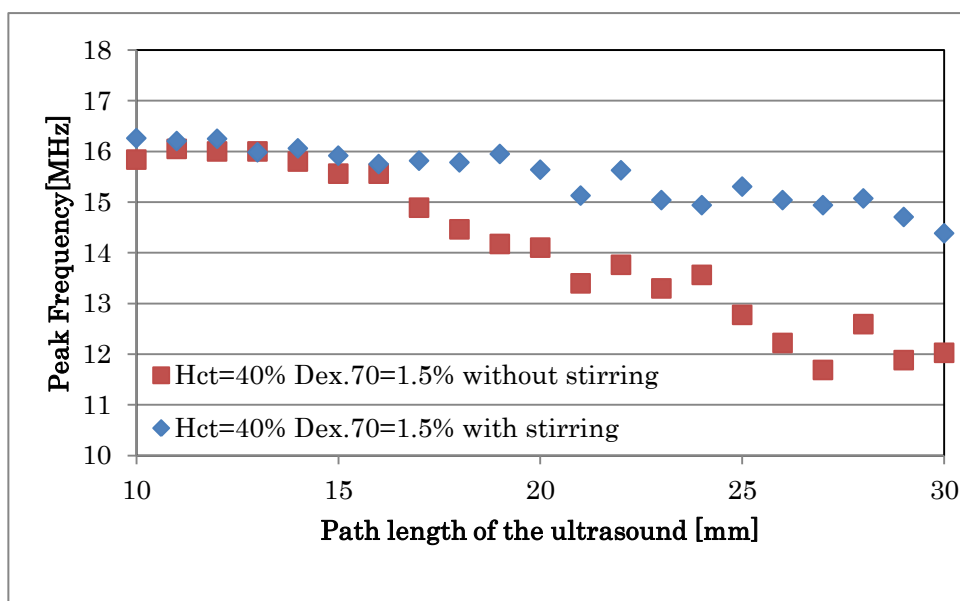


図 4.10 Hct=40%, Dex70=1.5%における攪拌の影響

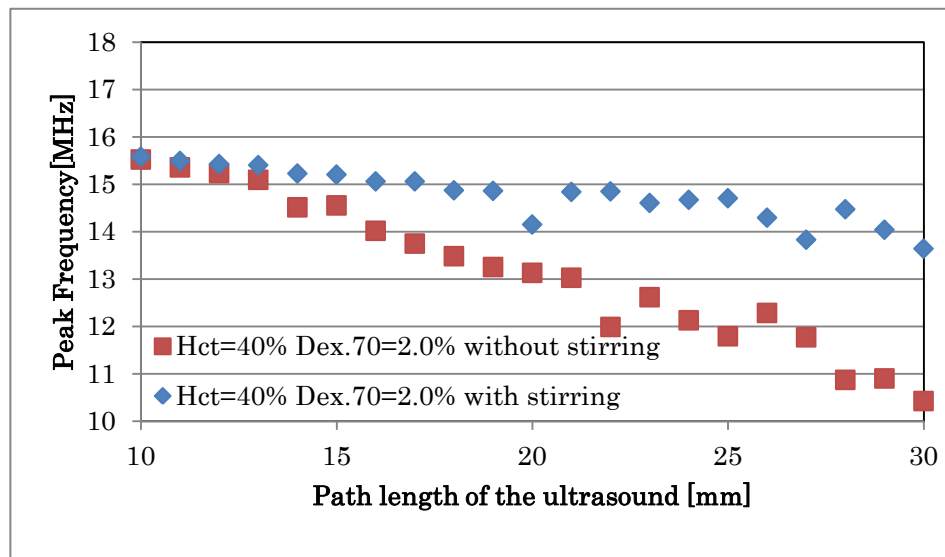


図 4.11 Hct=40%, Dex70=2.0%における攪拌の影響

Dex70 濃度 1.0%, 1.5%, 2.0%いずれの場合においても、攪拌しなかった場合より攪拌した場合のほうがピーク周波数が高かった。

ここで攪拌した場合の各結果と Dex70-10%水溶液を投入しない場合の測定結果とを比較した結果を以下の図 4.12 に示す。

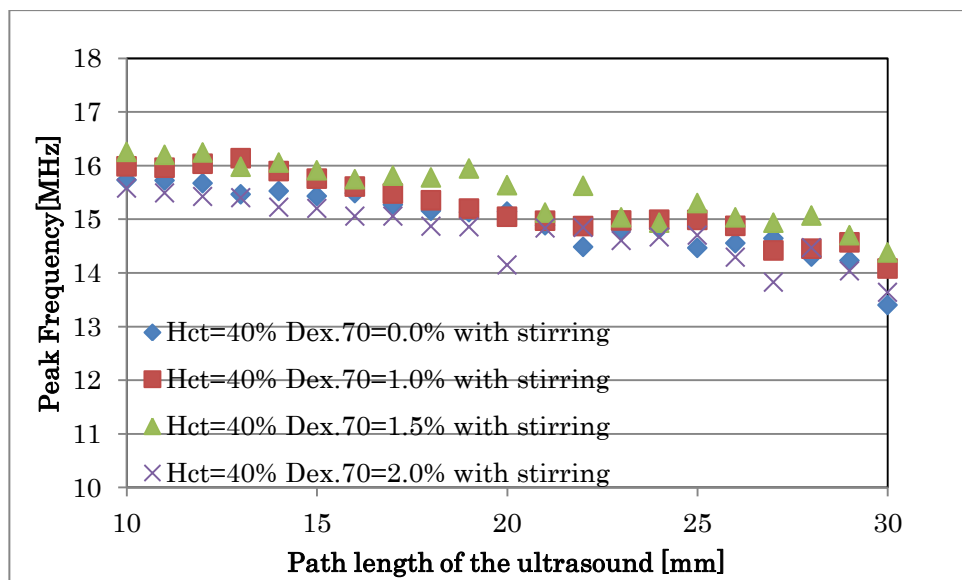


図 4.12 攪拌を行った場合の各 Dex70 濃度におけるピーク周波数の差異

この結果から 300rpm で攪拌を行い、Dex70 濃度を 1.0%, 1.5%, 2.0% で投入した場合のピーク周波数は Dex70 の水溶液を投入しない場合のピーク周波数と差がないことが分かる。

4.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響

Hct=40%, Dex70 濃度 1.0%に調整した血液サンプルに対して、攪拌を行わず超音波経路長を 10~30mm の範囲で変化させながら測定を行った。超音波経路長を 10→30mm と変化させた場合を順方向、超音波経路長を 30→10mm と変化させた場合を逆方向とし、以下の図 4.13 に示す。

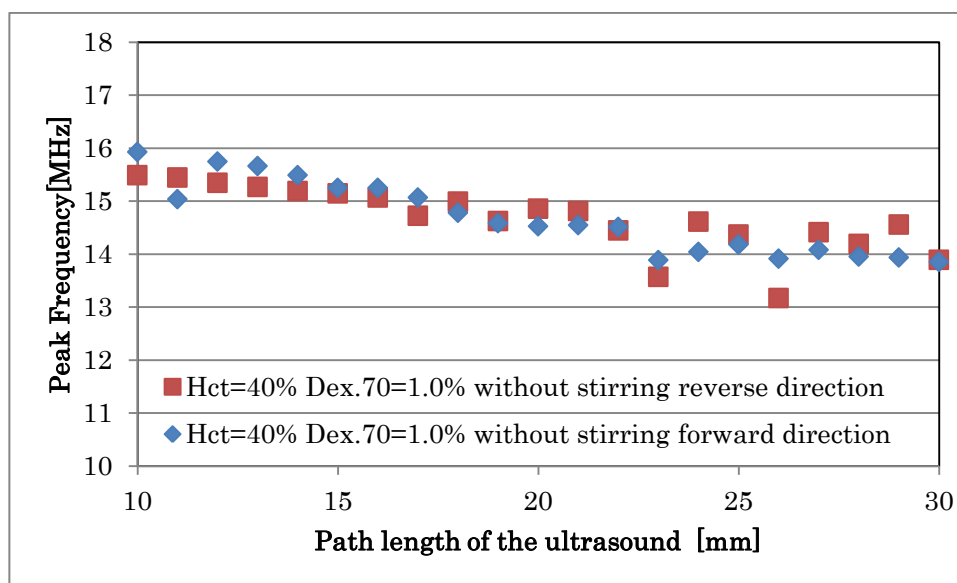


図 4.13 攪拌を行わない場合の時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響

超音波経路長を 10→30mm と変化させた場合、超音波経路長を 30→10mm と変化させた場合いずれの場合においても超音波経路長の増加に伴ってピーク周波数が低下したことがわかる。

4.3.4.ヘマトクリットの影響

Hct=30, 40, 50%に調整した血液サンプルに対して、超音波経路長を10~30mmの範囲で変化させながら測定を行った結果を以下の図4.14に示す。凝集剤は投入しないが、凝集剤を投入しない場合でも時間経過によって自然に凝集体が形成される可能性があるため、攪拌を行うことで凝集体の形成を防ぐ。

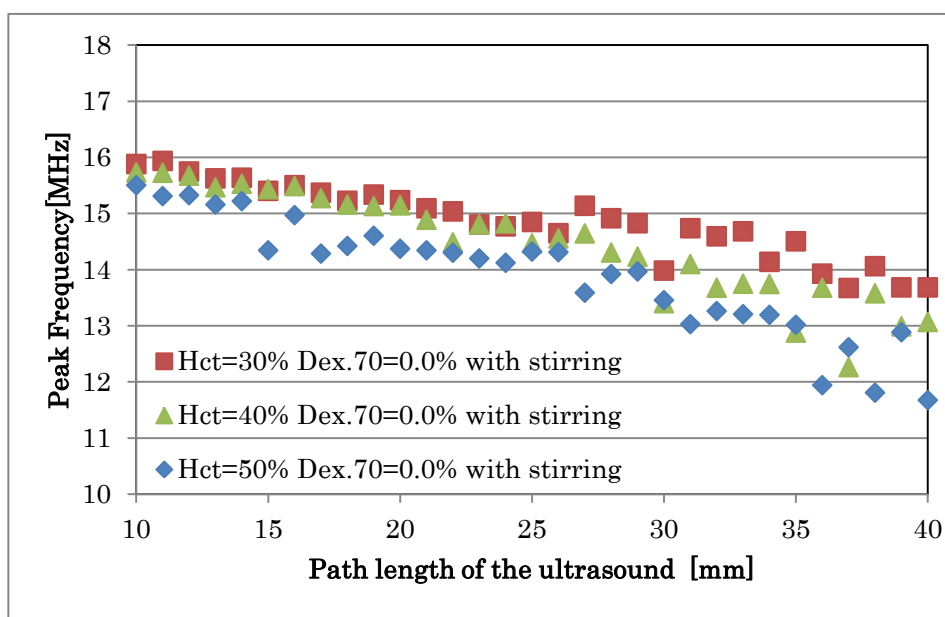


図 4.14 ピーク周波数測定におけるヘマトクリットの影響

以上のグラフから多くの超音波経路長において、ピーク周波数が Hct=30%の場合> Hct=40%の場合> Hct=50%の場合となっていることが分かる。

4.3.5.赤血球凝集度の影響

Hct=40%, Dex70 濃度 0.0, 1.0, 1.5, 2.0%に調整した血液サンプルに対して、10~30mm の範囲で変化させながら測定を行った結果を図 4.15 に示す。4.2.2.項および 4.2.3.項の結果から凝集体の破壊を防ぐため攪拌を行わない。

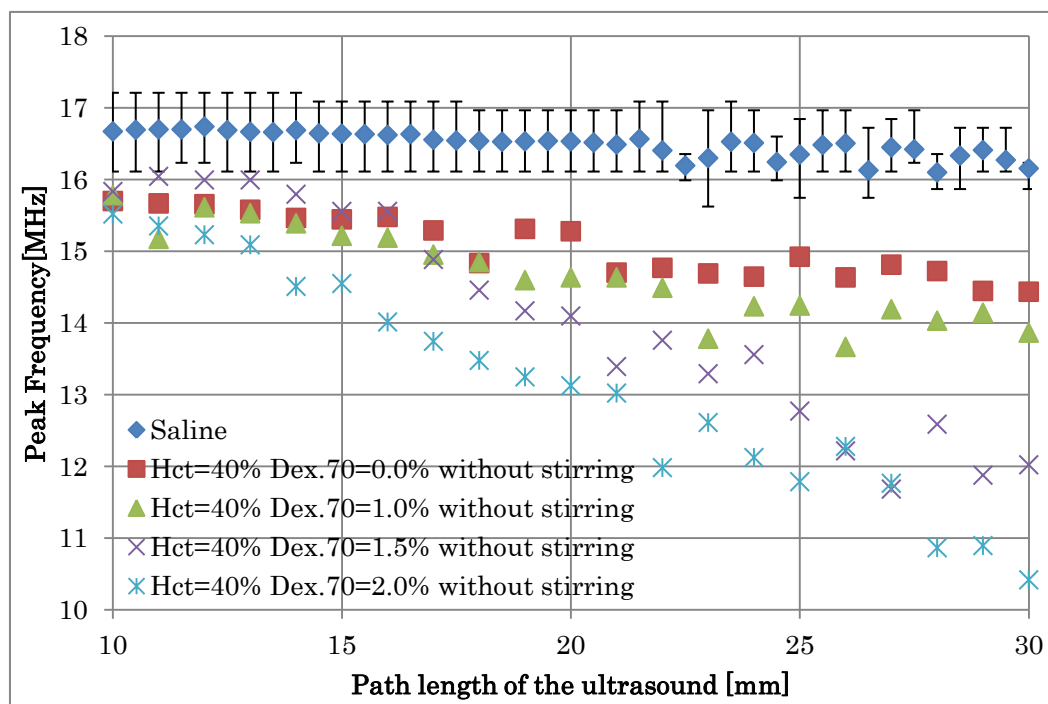


図 4.15 血液試料中でのピーク周波数測定における超音波経路長および Dex70 濃度の影響

4.2.1.項の結果から超音波の経路長が 20mm の場合が最も赤血球凝集度の測定に適していると考えられる。超音波の経路長が 20mm の場合のデキストラン濃度とピーク周波数の関係を以下の図 4.16 に示す。

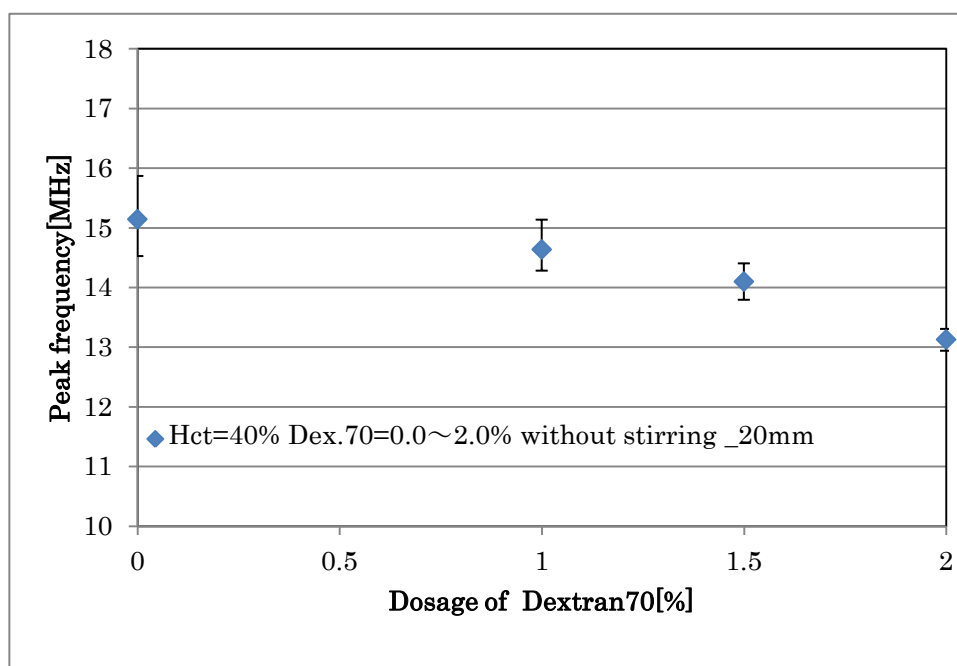


図 4.16 血液試料中での Dex70 投入量とピーク周波数の関係

以上の結果からデキストラン 70 の投入量によってピーク周波数が低下していることが示された。

第5章. 考察

5.1. 顕微鏡観察による凝集度評価

5.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価

4.1.1.項の実験結果から、アロンフロック C510 の 0.1%水溶液によってアクリル粒子の凝集径を制御することが可能であることが示された。

5.1.2. 低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価

4.1.2.項の実験結果から、デキストラン 70 によるによって赤血球の凝集径を制御することが可能であることが示された。

またこの実験結果は「ヒトおよびウマ血液におけるデキストランの凝集作用は濃度 2~3%で最大値をとり、それを超えると下降する」との知見と一致している[30]。

5.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

4.2.1.項 図 4.3 の実験結果では超音波の経路長が 3mm より小さい場合いずれの試料でも差が得られなかったが、これは超音波の経路中に含まれる粒子が少ないためであると考えられる。また超音波の経路長が 8mm より大きい場合もいずれの場合でも差が得られなかったが、これはいずれの試料でも超音波の経路中に含まれる多数の粒子によって超音波の高周波成分が減衰してしまったためであると考えられる。

4.2.1.項の実験結果より超音波の経路長がピーク周波数による懸濁液中の粒子凝集度測定において重要なパラメータであることが判明した。また、4.2.2.項の実験結果から超音波の経路長を適切に設定することで懸濁液中の粒子凝集度をピーク周波数測定によって測定することが可能であることが示された。

このアクリル凝集体懸濁液に対する実験の結果から、実際の血液に対する実験を行う際においても超音波の経路長を適切に設計する必要性が判明した。

5.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

5.3.1. 超音波の経路長の影響

高濃度アクリル凝集体懸濁液に対する実験の結果から超音波の経路長が重要なパラメータの一つであることが判明したため、血液試料に対しても同様の実験を行い適切な超音波の経路長の探索を行った。4.3.1.の結果から20mmが超音波の経路長の最適値であると判断したが、この結果は高濃度アクリル凝集体懸濁液に対する実験で得た超音波の経路長の最適値とは異なる値となった。これはアクリル粒子と赤血球の音響インピーダンスの違いや、アクリル粒子溶液作製の際アクリル粒子を質量濃度を用いて混合したことによりアクリル粒子の体積分率が質量濃度より小さくなったことが影響していると考えられる。

5.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響

4.3.2.の図 4.12 の実験結果よりデキストランを投入しない場合のピーク周波数とデキストランを投入し攪拌を行った場合の各ピーク周波数間に差が現れなかったことから、デキストラン 70 を投入することによって形成された赤血球凝集体は攪拌によって破壊されてしまうと考えられる。このことから本研究で目的とする赤血球凝集度とピーク周波数の関係を調査するためには攪拌を行わず測定を行うのが適切であると考え、攪拌を行わないことにより生じる変化を確認するため 4.3.3.の実験を行った。

5.3.3. 時間経過による凝集の増進および粒子・赤血球の沈降の影響

4.3.3.の図 4.13 の実験結果において、超音波経路長を10→30mmと変化させた場合、図 4.13 のグラフの横軸に沿って時間が経過する。対して超音波経路長を30→10mmと変化させた場合、図 4.13 のグラフの横軸30mmの測定点が経過時間0sであり、10mmの測定点が最も時間が経過した点である。時間経過に応じて赤血球の沈降や凝集体形成の増進が起これ、これが超音波高周波成分の減衰に影響を与える場合、これらの測定結果のグラフの傾きは相反すると予想される。したがって図 4.13 の結果から、本研究の実験条件下では攪拌を行わない場合において、時間経過に応じた赤血球の沈降や凝集体形成の増進は観察されなかったと考えられる。

5.3.4.ヘマトクリットの影響

超音波の経路長が変化することによってピーク周波数に影響を与えるのは超音波の経路中に存在する粒子の数が増えるためであると考えられる。したがってヘマトクリットもまたピーク周波数に影響を与えるパラメータであると考えられる。

4.3.3.の実験結果によりヘマトクリットが高い方がピーク周波数が低くなることが分かり、ヘマトクリットもまたピーク周波数に影響を与えるパラメータであることが判明した。この結果から「低 Hct, 高凝集度」の場合と「高 Hct, 低凝集度」の場合において同じピーク周波数が得られる可能性があり、各ヘマトクリット、凝集度におけるピーク周波数の詳細な調査が今後の課題となる。

5.3.5.赤血球凝集度の影響

4.1.2.項の結果からデキストラン 70 の投入量によって平均の凝集径が大きくなっていることが示されており、4.3.4.の結果からデキストラン 70 の投入量によってピーク周波数が低下することが示された。これらの結果から赤血球の平均凝集径のピーク周波数による測定の可能性を示すことができた。

第6章. まとめ

本研究では血液代替試料および赤血球凝集度を調整した血液試料に対して超音波ピーク周波数測定を行い、超音波ピーク周波数による赤血球凝集度測定の可能性を示した。

今後の課題

本研究では超音波ピーク周波数と赤血球凝集度の関係を調査したが、今後の研究で血液粘度・赤血球凝集度、血液粘度・ピーク周波数間の関連性を調査することで、ピーク周波数による血液粘度推定の可能性を示す必要がある。また、本研究の 4.3.4.の結果から Hct もピーク周波数に影響を与えるパラメータであることが判明した。Hct は血液粘度に影響を与えるパラメータであることが知られており[15]、Hct の血液粘度・赤血球凝集度・ピーク周波数に対する影響をより詳細に調査する必要がある。

参考文献

- [1] S. H. Wang and K. K. Shung : “In vivo measurements of ultrasonic backscattering in blood” , IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Contr., Vol.48, pp.425-431 (2001)
- [2] G. Cloutier and K. K. Shung : “Study of red cell aggregation in pulsatile flow from ultrasonic doppler power measurements” , Biorheology, Vol.30, pp.443-461 (1993)
- [3] François T. H. Yua and G. Cloutier : “Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator” , J. Acoust. Soc. Am., Vol.122, pp.645-656 (2007)
- [4] K. H. Nam, D. G. Paeng, and M. J. Choi : “Ultrasonic backscatter from rat blood in aggregating media under in vitro rotational flow” , IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control., Vol.56, No.2, pp.270-279 (2009)
- [5] C. C. Huang : “Cyclic variations of high-frequency ultrasonic backscattering from blood under pulsatile flow” , IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Contr., Vol.56, pp.1677-1688 (2009)
- [6] N. Saitoh, H. Hasegawa, and H. Kanai : “Estimation of Scatterer Diameter Using Ultrasonic Backscattering Property for Assessment of Red Blood Cell Aggregation” , Jpn. J. Appl. Phys., Vol.48, 07GJ08 (2009)
- [7] T. Fukushima, H. Hasegawa, and H. Kanai : “Estimation of Scatterer Diameter by Normalized Power Spectrum of High-Frequency Ultrasonic RF Echo for Assessment of Red Blood Cell Aggregation” , Jpn. J. Appl. Phys., Vol.50, 07HF02 (2011)
- [8] T.Sato, H.Tojo, and Y.Watanabe : “Highly Sensitive Detection of Red Blood Cell Aggregation with Ultrasonic Peak Frequency” , Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 52 no. 7, 07HF18-07HF18-6 (2013)
- [9] 有馬正浩, 佐藤隆幸, 渡部泰明: “超音波スペクトロスコピー法における小粒子凝集体と代替大粒子の実験的補正法” , 電気学会論文誌C分冊, Vol. 134, No. 1, pp.28-34 (2014)
- [10] 佐藤 隆幸, 須永 涼, 山岸 直生: “画像相関法に基づいた体外循環時の赤血球凝集度評価方法に関する検討” , 電気学会論文誌C分冊, Vol. 136, No. 10, pp.1437-1444 (2016)
- [11] Nobutaka Saitoh, Hideyuki Hasegawa, Hiroshi Kanai: “Assessment of red blood cell aggregation using normalized power spectrum of high frequency ultrasound”, 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings, pp.1975-1978(2008)

- [12] Franceschini, E. ; Lab. of Mech. & Acoust., LMA, CNRS, Marseille, France ; Yu, F.T.H. ; Destrempes, F. ; Cloutier, G., “In vivo ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the Structure Factor Size and Attenuation Estimator”, Ultrasonics Symposium (IUS), 2009 IEEE International, (2009)
- [13] Nobutaka Saitoh, Hideyuki Hasegawa, and Hiroshi Kanai, “Estimation of Scatterer Diameter Using Ultrasonic Backscattering Property for Assessment of Red Blood Cell Aggregation”, Japanese Journal of Applied Physics, Volume 48, Number 7S, (2009)
- [14] Hirofumi Taki, Kousuke Taki, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Motoi Kudo, and Toru Sato, “High-range-resolution imaging using frequency domain interferometry with stabilization techniques for real-time vascular ultrasound”, Japanese Journal of Applied Physics, Volume 54, Number 7S1, (2011)
- [15] Oguz K. Baskurt, M.D., Ph.D., Herbert J. Meiselman, Sc.D., “Blood Rheology and Hemodynamics” The Hyperviscosity Syndromes; Editor in Chief, Eberhard F. Mammen, M.D.; Guest Editor, Hau C. Kwaan, M.D., Ph.D. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, volume 29, number 5, (2003).
- [16] G. D. O. Lowe, J. M. Lowe, M. M. Drummond, S. Reith, J. J. F. Belch, C. M. Kesson, A. Wylie, W. S. Foulds, C. D. Forbes, A. C. MacCuish, and W. G. Manderson : “Blood viscosity in young male diabetics with and without retinopathy” , Diabetologia, Vol.18, No.5, pp.359-363 (1980)
- [17] M. Melli, M. Poggi, L. Codeluppi, P. Baraldi, F. Torlai, and M. Peduzzi : “Blood viscosity and erythrocyte deformability in diabetic retinopathy”, Diabetologia, Vol.13, No.3, pp.371-374 (1983)
- [18] S. M. MacRury, M. Small, A. C. MacCuish, and C. D. Lowe : “Association of hypertension with blood viscosity in diabetes”, Diabetic Med., Vol.5, No.9, pp.830-834 (1988)
- [19] E. Franceschini, B. Metzger, and G. Cloutier : “Forward Problem Study of an Effective Medium Model for Ultrasound Blood Characterization”, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control, Vol.58, No.12 (1992)
- [18] 川口春馬: “有機分散系の分散・凝集技術” , 株式会社シーエムシー出版, pp.70-72 (2008)
- [21] A.S.Dukfin and P.J.Goetz: “Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change”, John Wiley and Sons (2006)

- [22] A.S.Dukfin and P.J.Goetz: “Ultrasound for Characterizing Colloids”, Elsevier (2002)
- [23] Shlomo Berliner, Ronen Ben-Ami, Dorit Samocha-Bonet, Subchi Abu-Abeid, Vered Schechner, Yitzhak Beigel, Itzhak Shapira, Saul Yedgar, Gershon Barshtein, “The degree of red blood cell aggregation on peripheral blood glass slides corresponds to inter-erythrocyte cohesive forces in laminar flow”, *Thrombosis Research*, Vol 114, Issue 1, pp.37–44 (2004)
- [24] Richard K. Johnson, “Sound scattering from a fluid sphere revisited”, *Acoustical Society of America, J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 61, No. 2, pp.375-377 (1977)
- [25] Masahiro Yamanari, Yoshiaki Yasuno, Toyohiko Yatagai, and Masahide Itoh “Analysis of the Polarization Dependence of Multiple Backscattering Light from Red Blood Cell Suspensions”, *光学* 34(2), 90-96, 応用物理学会分科会日本光学会 (2005)
- [26] 岡小天, : “バイオレオロジー(改訂改題)”, 物理化学選書7, 今井功, 小谷正雄, 森野米三, 永田武, 高橋秀俊 編集, 東京裳華房, (1984).
- [27] H. Bäumlér, B. Neu, E. Donath, H. Kieseewetter : “Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation”, *Biorheology* 36 (1999) 439-442 IOS Press (1999).
- [28] 内村功, : “〈フィブリノーゲン〉”, 日本バイオレオロジー学会誌Vol. 2 (1988) No. 3 p. 39, (1988).
- [29] 奈良 信雄, “特集これだけは知っておきたい検査のポイント第8集”, *medicina* 47巻 11号 pp. 56-59, 赤血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリット, 赤血球指数, 網赤血球, (2010)
- [30] Oguz K. Baskurt, Robert A. Farley, and Herbert J. Meiselman: “Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study”, *Am. J. Physiol. - Heart and Circul. Physiol.*, Vol. 273, No. 6, pp. H2604-H2612 (1997)

謝辞

本研究を進めるにあたり, 様々なご指導を頂きました佐藤隆幸助教に厚く御礼申し上げます。またお世話になりました研究室の皆様に深謝致します。

修 士 学 位 論 文

体外循環時における 超音波スペクトルピーク周波数を用いた赤血球凝集度測定

指導教授

渡部 泰明 教授

平成 2 9 年 2 月 1 7 日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 電気電子工学 専攻

学修番号 1 5 8 8 2 3 3 8

氏 名 渡 邊 祥

第 1 章. 序論	4
1.1. 背景.....	4
1.2. 血液粘度と赤血球凝集度	5
1.3. 本研究の位置づけ	5
第 2 章. 原理	6
2.1. 超音波による懸濁液の測定	6
2.2. アクリル粒子による赤血球の模擬	7
第 3 章. 方法	8
3.1. 試料作製	8
3.1.1. アクリル粒子溶液作製	9
3.1.2. 血液試料調整	12
3.2. 顕微鏡観察による凝集度評価	16
3.3. 超音波ピーク周波数スペクトル測定.....	18
3.3.1. 超音波の経路長の影響	20
3.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響	20
3.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響	21
3.3.4. ヘマトクリットの影響	21
第 4 章. 結果	22
4.1. 顕微鏡観察による凝集度評価	22
4.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価	22
4.1.2. 低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価	23
4.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	24
4.2.1. 超音波の経路長の影響	24
4.2.2. アクリル粒子凝集度の影響	25
4.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	26
4.3.1. 超音波の経路長の影響	26
4.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響	28
4.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響	30
4.3.4. ヘマトクリットの影響	31
4.3.5. 赤血球凝集度の影響	32

第 5 章. 考察	34
5.1. 顕微鏡観察による凝集度評価	34
5.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価	34
5.1.2. 低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価	34
5.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	34
5.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定	35
5.3.1. 超音波の経路長の影響	35
5.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響	35
5.3.3. 時間経過による凝集の増進および粒子・赤血球の沈降の影響	35
5.3.4. ヘマトクリットの影響	36
5.3.5. 赤血球凝集度の影響	36
第 6 章. まとめ	37
今後の課題	37
参考文献	38
謝辞	40

第1章. 序論

1.1. 背景

血液粘度は糖尿病に代表される生活習慣病をはじめとした様々な疾患と関連の強い健康指標として注目されている。また、これを測定する方法としては健常者が日常的にセルフチェックを行えるような方法が理想である。このことから簡便に測定が可能であり、定量的であり、採血による身体的・経済的な負担や手間が少ない方法が求められている。このような条件から血液粘度測定において、超音波による非侵襲かつ定量的な測定手法に対する期待は大きい[1]~[7]。しかしながら、高濃度懸濁液中の粒子凝集度および全血中の赤血球凝集度の制御・確認の困難性から、これらを定量的に把握した上で超音波の応答を検討した先行研究は例が少ない[8]~[12]。そのため、目下の目標となるのは血液粘度と超音波測定によって得ることが可能な情報との関係の基礎的な調査である。したがって本研究では測定端子が直接血液に浸水した状態で測定を行うことを前提としたシステムを構築した。現状のシステムでは直ちに非侵襲な測定手法として臨床に応用することはできないが、臨床においてこのような制約条件下でも血液粘度測定が可能な機会が存在する。それは人工透析や人工心肺などに代表される体外循環治療時である。またこれらの治療が施される患者は血液粘度測定のニーズが高いことから体外循環治療時は超音波探触子浸水条件下での血液粘度測定の好機であると考えた。したがって本研究では体外循環治療時を前提とした超音波による血液粘度測定を目標とする。

非侵襲的な測定という観点からアプローチし、超音波による *in vivo* 計測を行う事で実際に皮膚越しに血液粘度を測定することを目標とした研究が行われている[13], [14]。しかしながらこれらの研究では血液粘度と超音波特性の定量性に関する基礎的な調査がなされていない。このことから本研究が目標とする血液粘度と超音波測定によって得ることが可能な情報との関係の基礎的な調査が必要であると考えられる。

超音波探触子浸水条件下での測定を前提とした場合、従来の血液粘度の測定手法として広く知られている Micro Channel array Flow Analyzer(MCFAN)を用いることや、振動式・回転式の粘度計によって粘度を測定する手法を用いることが可能となる。MCFAN による測定では毛細管内における血液流動性から血液粘度を測定するが、血液粘度上昇の主要因の一つである赤血球の凝集体は毛細血管内では破壊されることが知られている[15]。そのため MCFAN では毛細血管を想定した血液粘度測定を行うことができるが、大血

管内での血液粘度を正確に推定することはできていないと考えられる。

また、赤血球の凝集体は振動などによっても容易に破壊されることが知られている[15]。このことから従来の粘度測定手法も血液粘度上昇の主要因の一つである赤血球の凝集体に影響を与えてしまうため、大血管内を想定した血液粘度の測定には適さないと考えられる。

1.2. 血液粘度と赤血球凝集度

血液粘度と血液中の赤血球凝集度（赤血球凝集体の大きさ、および大きい凝集体の形成頻度）との間には強い相関関係があることが知られており、血液粘度を測定することを目的とした研究の多くがこの関係性に立脚している[8]~[12], [16]~[19]。本研究においてもこの関係性に着目し赤血球凝集度を測定することによって血液粘度を推定することを目標とした実験を行った。

1.3. 本研究の位置づけ

ヒトの血液は赤血球が体積密度（ヘマトクリット、以下 Hct）35~50%で血漿中に分散している状態の懸濁液であると考えられることができる。これまでの研究では凝集度の制御・確認および超音波による測定が容易である質量濃度5%程度の低濃度のアクリル粒子懸濁液を血液模擬試料として用いてきた[8], [9]。これは、赤血球の凝集度を制御・確認することが非常に困難であったことや、アクリル粒子の反射・散乱の強度が赤血球よりも強く超音波による測定手法の有効性を確認することが容易であると考えられたためである。しかしながら、この代替試料を用いた先行研究では全血における赤血球の状態と比較して粒子・赤血球の濃度が著しく異なることや、アクリル粒子と赤血球では反射・散乱の強度が異なることなどから、実際の血液に対して測定を行った場合の超音波による測定手法の有効性を十分に示せていなかった。このような問題点を解決するため本研究ではまず40%の高濃度のアクリル粒子溶液に対して超音波による凝集度測定を試みることで、高濃度の懸濁液中においても超音波測定手法が有効であることを確認する。続いてこの結果を用いて構成した実験系で赤血球凝集度を調整した実際の血液に対して超音波測定手法が有効であることを確認する。本研究ではヒトの血液との類似性、入手が容易な点、報告例が多いことなどの理由からブタ血液を使用して実験を行う。

第2章. 原理

2.1. 超音波による懸濁液の測定

超音波を溶液に対して照射し透過波を測定した場合、透過波では入射波から溶液中で減衰した成分を差し引いたものが測定される。溶媒中に粒子が分散している状態の溶液、すなわち懸濁液に超音波を照射した場合、超音波の減衰は主に粘性損失、熱的損失、散乱損失によって起こり、直径 $3\mu\text{m}$ 以上の粒子が分散している懸濁液においては散乱損失による減衰が支配的となることが知られている[18]~ [22]。

ヒトの場合赤血球は直径がおよそ $7\sim 8\mu\text{m}$ 、厚さが $2\mu\text{m}$ の円盤状であり、赤血球の凝集体は大きいもので数十 μm 程度である[23]。対して医療用として通常用いられる数 M~数十 MHz の超音波の波長はおよそ $75\sim 1000\mu\text{m}$ である。これらの赤血球および赤血球凝集体の径と超音波の波長の関係からここでの散乱損失による減衰は Rayleigh 散乱によるものが支配的となる[24], [25]。Rayleigh 散乱が支配的となる条件下では粒子や凝集体の径が大きくなるほど高周波の減衰が大きくなり、結果として超音波スペクトル上においてピークとなる周波数が低下する。

本研究ではこれを利用することで超音波スペクトルピーク周波数を測定し、アクリル粒子径およびアクリル粒子・赤血球の凝集度を測定することを目指す。

2.2. アクリル粒子による赤血球の模擬

本研究では溶液中の粒子の粒径および粒子の凝集度とピーク周波数との関係を調査するため、径が既知であるアクリル粒子を用いて以下の方法で赤血球凝集体を模擬する。図 2.1 のように赤血球に近いサイズのアクリル粒子の溶液に凝集作用のある薬剤を投入し実際にアクリル粒子の凝集体を形成することで赤血球凝集体を模擬する方法である。ここではヒトの赤血球の直径約 $7\sim 8\mu\text{m}$ に近い $6.5\mu\text{m}\phi$ のアクリル粒子懸濁液に凝集剤を加えることでアクリル凝集体懸濁液を作製する。これを用いることで様々な凝集径や複雑な形状を持つことが予想される赤血球の凝集体をより正確に模擬することが可能である。

先行研究では図 2.2 のようにひとつひとつの凝集体を超音波に対して等価な球相当径を持った一つの大きな粒子であると考えて $6.5\sim 110\mu\text{m}\phi$ の大小のアクリル粒子を用いて赤血球凝集体を模擬する方法も用いていたが、本研究では図 2.1 の様な方法を用いることで様々な凝集径や形状を持つ赤血球凝集体をより正確に赤血球の凝集体を模擬する。

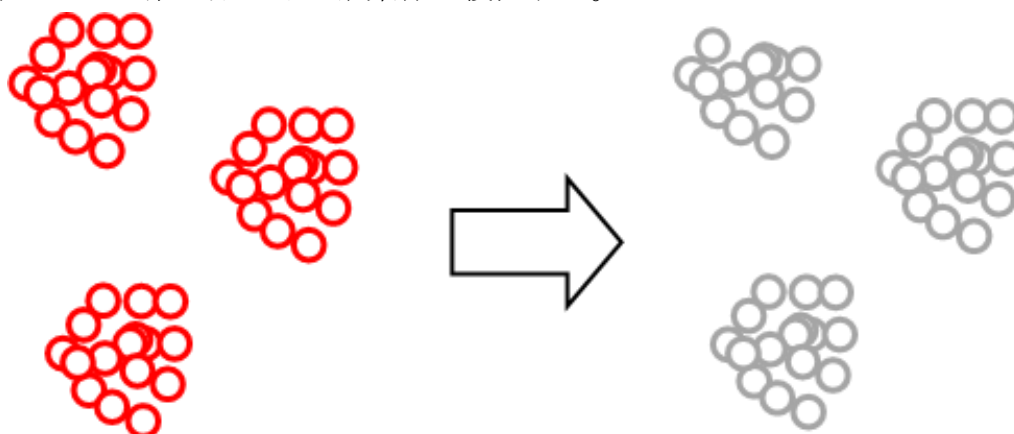


図 2.1 小径アクリル粒子+凝集剤溶液による赤血球凝集体の模擬

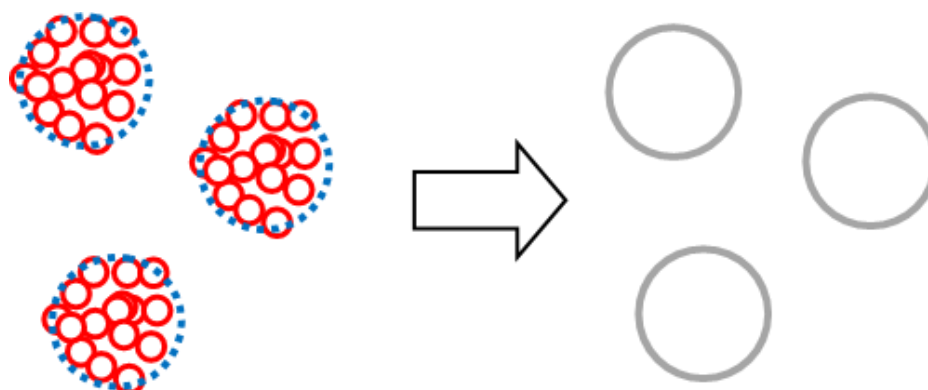


図 2.2 大径アクリル粒子による赤血球凝集体の模擬

第3章. 方法

3.1. 試料作製

本研究ではアクリル粒子サンプルおよび豚血液サンプルを作製する。以下の表 3.1 に示す薬品・試料、および機器を使用し、サンプルを作製する。

表 3.1 使用する薬品および試料、機器

名	製造社名	品名・型番
アクリル粒子	根上工業	アートパール GR-800(6.5 μ m ϕ)
豚血液	芝浦臓器	抗凝固剤(クエン酸ナトリウム水溶液)入り
クールインキュベータ	MEE	CN-40A
電子天秤	AND	EK-410i
カルボキシメチルセルロース(CMC)	関東化学株式会社	
アロンフロック	MT アクリルポリマー(株)	C-510
デキストラン 70	TCI	
真空ポンプ	ULVAC	DA-20D
遠心分離機	AS ONE	CN-2060
ヘマトクリット遠心機	株式会社コクサン	H-1200C

本研究では超音波測定を目的とした実際の血液に近い状態の Hct=40%付近の血液サンプルおよびそれを模擬した質量濃度 40%の高濃度のアクリル凝集体懸濁液（小粒径アクリル粒子＋凝集剤溶液）、顕微鏡観察により凝集剤の凝集作用を確認するための Hct=5%に調整した血液サンプルおよび質量濃度 5%の低濃度の小粒径アクリル凝集体懸濁液の 4 パターンのサンプルを作製する。

本研究では粉末状態のアクリル粒子の体積を正確に測定することが困難であることからアクリル粒子溶液の調整には質量濃度を用いるが、血液中の赤血球と血漿の比を表わす Hct は体積分率である。アクリルの比重が約 1.19~1.40 であることから、質量濃度を用いてアクリル粒子溶液を作製すると体積分率は質量濃度より小さくなると考えられる。

3.1.1. アクリル粒子溶液作製

上記の通りアクリルの比重は約 1.19~1.40 と水や生理食塩水などより比重が大きいため、単にアクリル粒子と溶媒となる水などと混合すると沈殿し堆積してしまう。粒子が分散状態にない場合、本研究で行う顕微鏡観察および超音波測定いずれの実験においても粒子や凝集体ひとつひとつを正確に捉え測定することが困難となる。そのため本研究では水にカルボキシルメチルセルロース（以下 CMC）を重量比で 1%混合し、粘度を高めた CMC 溶液を溶媒として用いることでアクリル粒子の沈殿を防ぐ。

またアクリル粒子と CMC1.0%溶液を混合する際多くの気泡が混入してしまうが、溶液への気泡の混入は超音波測定において大きな誤差の要因となりうる。そのため本研究ではサンプル作製後真空ポンプを用いて脱気することで溶液サンプル中の気泡を取り除く。

凝集剤にはアロンフロック C510 を用いる。本来の用途は下水や産業排水中の汚泥の処理であるが、非常に低濃度でアクリル粒子溶液に混入することでアクリル粒子に対して凝集作用を持つことが知られている。本研究では 0.1%に調整したアロンフロック C510 水溶液を凝集剤溶液としてアクリル粒子溶液に投入しアクリル凝集径の従量制御を行う。

アクリル粒子は人の赤血球と近いサイズを持つ $6.5\mu\text{m}\phi$ のものを使用する。

アクリル粒子を使用する 2 種類のサンプルはそれぞれ以下の方法で作製する。

- ・ 顕微鏡観察用小粒径アクリル+凝集剤による模擬赤血球凝集体溶液
 $6.5\mu\text{m}\phi$ のアクリル粒子が質量比で 5%、アロンフロック C510 の 0.1%水溶液が 0~15%となるように CMC1.0%水溶液の量を調整し混合する。
- ・ 高濃度小径アクリル粒子+凝集剤による模擬赤血球凝集体溶液
 $6.5\mu\text{m}\phi$ のアクリル粒子が質量比で 40%、アロンフロック C510 の 0.1%水溶液が 0~15%となるように CMC1.0%水溶液の量を調整し混合する。

分量などを含めた具体的なそれぞれのサンプルの作製フローは次ページ以降図 3.1、図 3.2 のようになる。

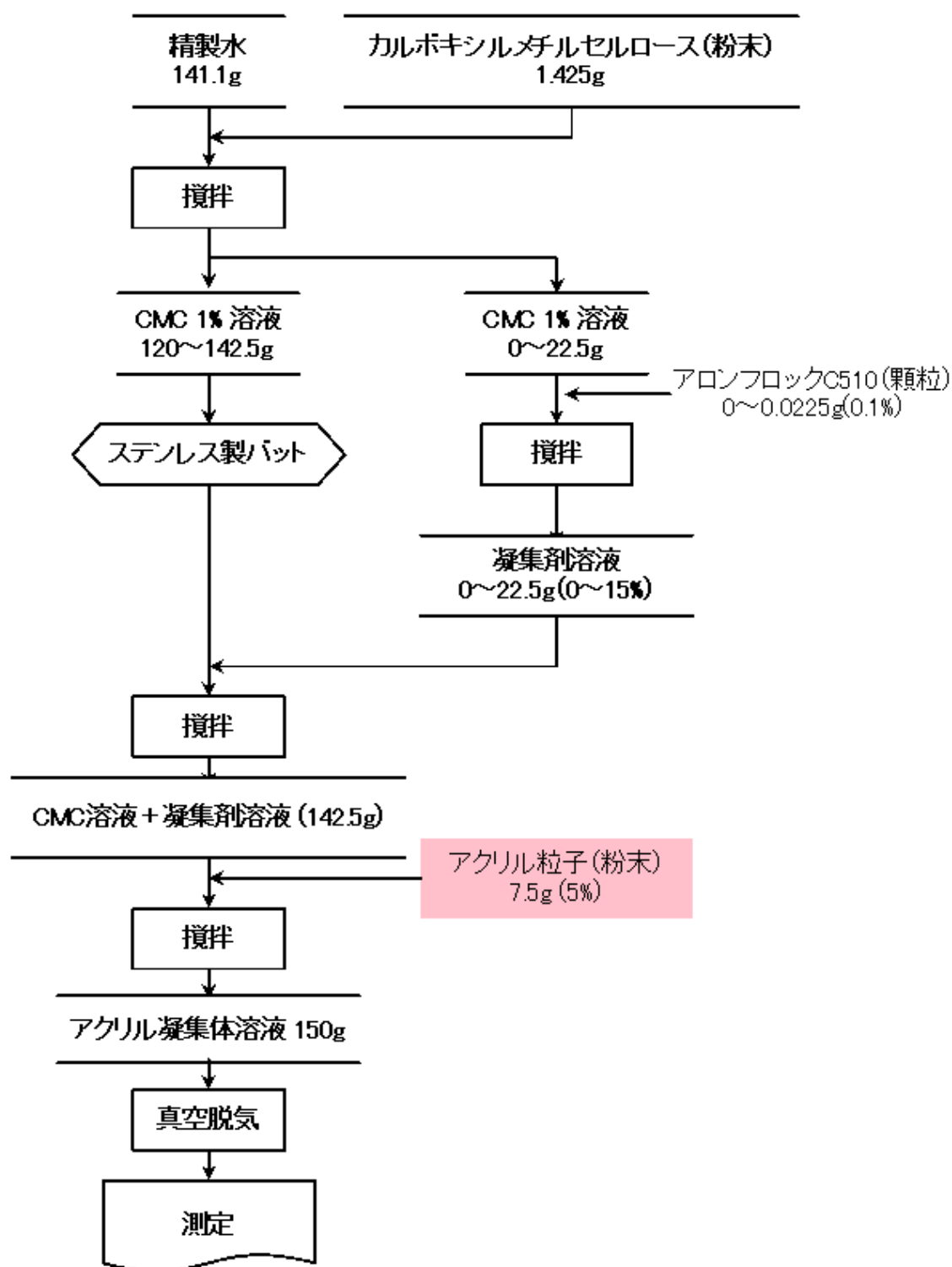


図 3.1 低濃度 $6.5\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子+凝集剤による赤血球凝集体模擬試料の調
整手順

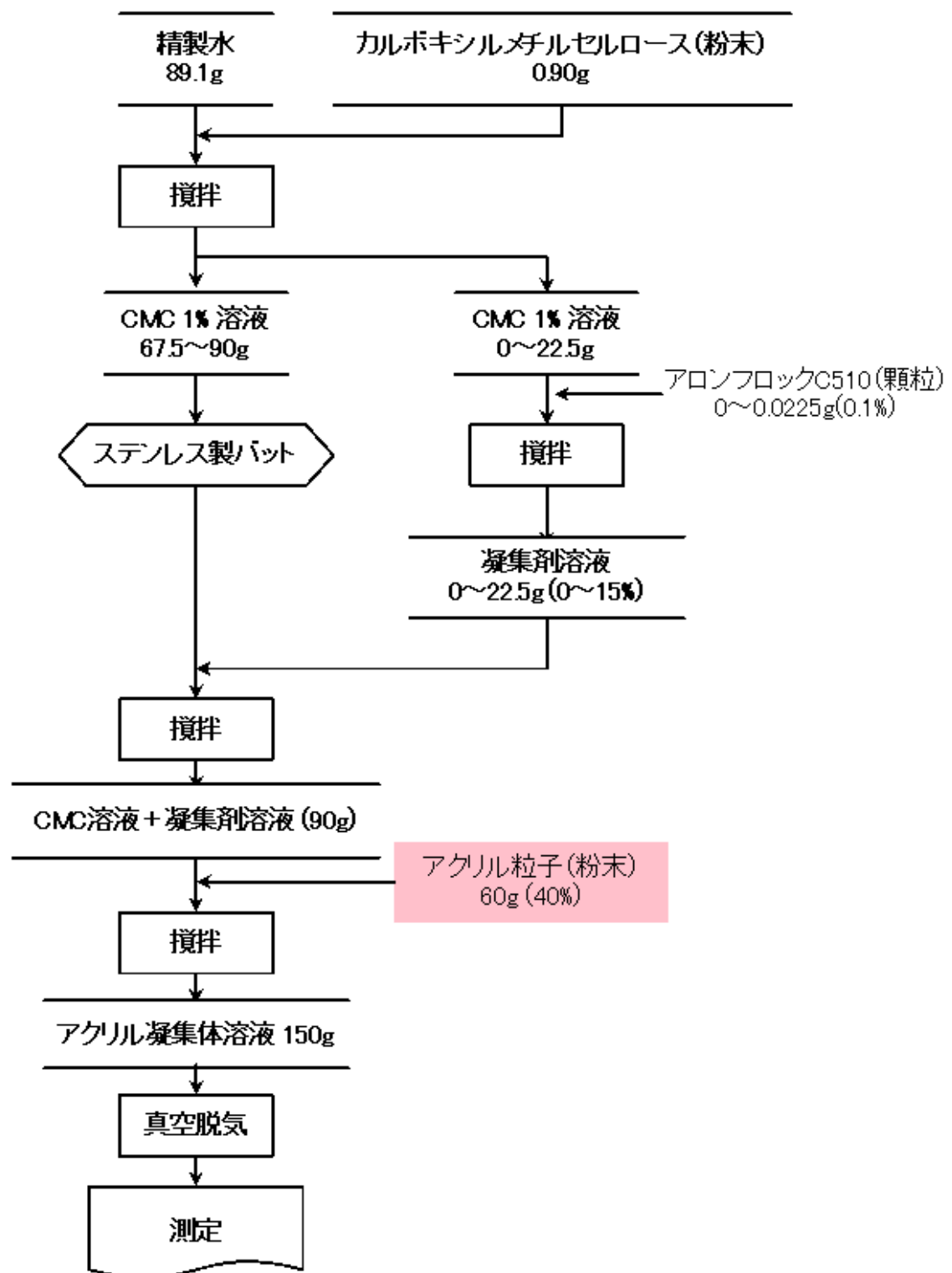


図 3.2 高濃度 6.5 $\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子+凝集剤による赤血球凝集体模擬試料の調整手順

3.1.2.血液試料調整

赤血球を凝集させる作用が知られている物質にはポリブレン、レクチン、デキストランなどがあるが[15], [26]~[28]、本研究では分子量が 70kDa のデキストラン 70 を用いる。デキストラン 70 は粉上の物質であり、全血に直接デキストラン 70 を投与すると溶け残りができ易くなってしまう。このため本研究では生理食塩水に 10wt%でデキストラン 70 を加えたデキストラン 70-10%水溶液を作製しこれを血液に混入する。

本研究では入手が比較的容易であり報告例も多い豚の血液を用いて実験を行うが、豚の健康状態など豚の個体差によって Hct や赤血球凝集度に影響を与える血漿中のタンパク質の濃度などに差が出ると考えられる。複数のブタから採血した血液を用いた実験においてこれによって生じる誤差を抑えるため本研究では洗浄赤血球を生理食塩水と所望の Hct となるよう混合したものを血液サンプルとして使用する。

洗浄赤血球は以下のような方法で作製する。まず全血を遠心分離により血球成分と血漿成分を分離したものから血漿成分を取り除く。続いて取り除いた血漿と同量の生理食塩水を加え攪拌したのち、再び遠心分離を行う。その後再び血球以外の成分を取り除いたものを洗浄赤血球として実験を行う。ここで行う遠心分離は遠心分離機 CN-2060 を用いて回転数 3,000rpm で 10 分間の条件で行う。

作製した洗浄赤血球は少量の生理食塩水と混合したのち Hct を測定する。Hct は測定専用の毛細管および遠心機を用いてブタ血液原試料の Hct を測定する。ブタ血液を毛細管内に封入し、これを Hct 測定時の標準的な条件である 12,000r.p.m.で 5 分間遠心処理する。ここで用いるのはヘマトクリット遠心機 H-1200C である。遠心処理後、血球成分と生理食塩水成分に分離した毛細管内の血液に対して測定用スケールを用いることで Hct を測定することが可能である。

2 種類のサンプルはそれぞれ以下の方法で作製する

- ・低濃度血液サンプル

低濃度の血液サンプルの場合洗浄赤血球を用いると凝集剤投入後も赤血球の凝集の増大が観察されなかった。Hct=5%の場合 Hct=40%の場合と比べて赤血球の数が著しく少ないため、赤血球同士の接近・接触の機会が非常に少なくなり、赤血球凝集の形成頻度も低くなると考えられる。洗浄赤血球ではなく入手した血液試料をそのまま生理食塩水で Hct=5%に調整した場合、Hct=5%でもデキストランの投入によって凝集度を調整

することができたが、これは自己血漿中に含まれるアルブミン、グロブリン、フィブリノゲンなどのタンパク質成分が凝集に対して作用したためと考えられる[15], [26]~[28]。洗浄赤血球を用いるのはこれらのタンパク質成分による差異を減少させるためであるが、本項ではデキストランの投入による赤血球凝集度の従量制御の可能性を調査することが目的であるため、自己血漿を含む全血を生理食塩水の混合によって以下の様に調整した血液試料を用いる。

測定した元の血液試料の Hct に基づいて、Hct=5.0%、デキストラン 70 の濃度が 0~2.5%となるようにデキストラン 70-10%水溶液および生理食塩水の量を調整し混合する。

- ・ 高濃度血液サンプル

洗浄赤血球作製後に測定した Hct に基づいて、Hct=30~50%、デキストラン 70 の濃度が 0~2.0%となるようにデキストラン 70-10%水溶液および生理食塩水の量を調整し混合する。

分量などを含めた具体的なそれぞれのサンプルの作製フローは次ページ以降図 3.3、図 3.4、図 3.5 のようになる。

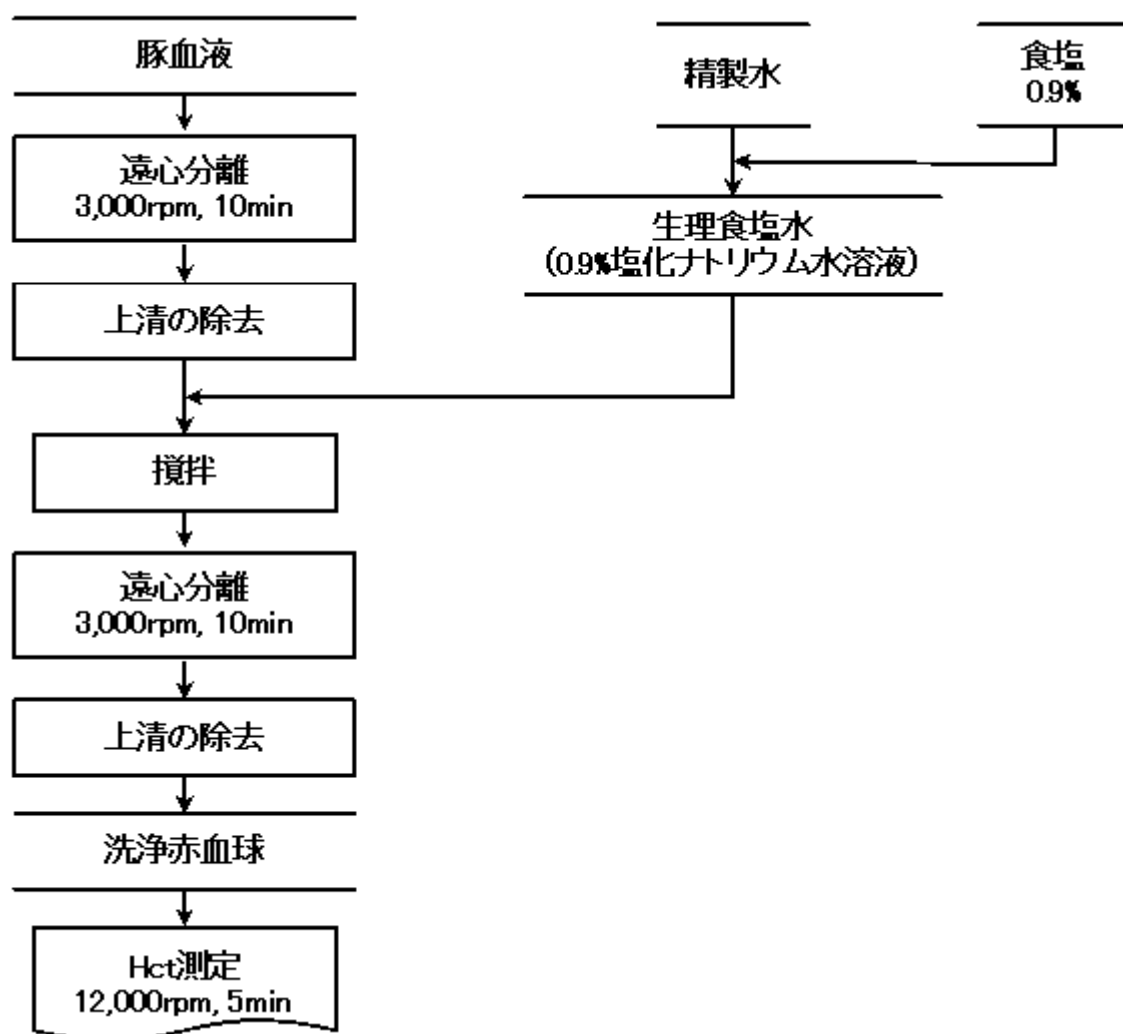


図 3.3 洗浄赤血球の作製手順

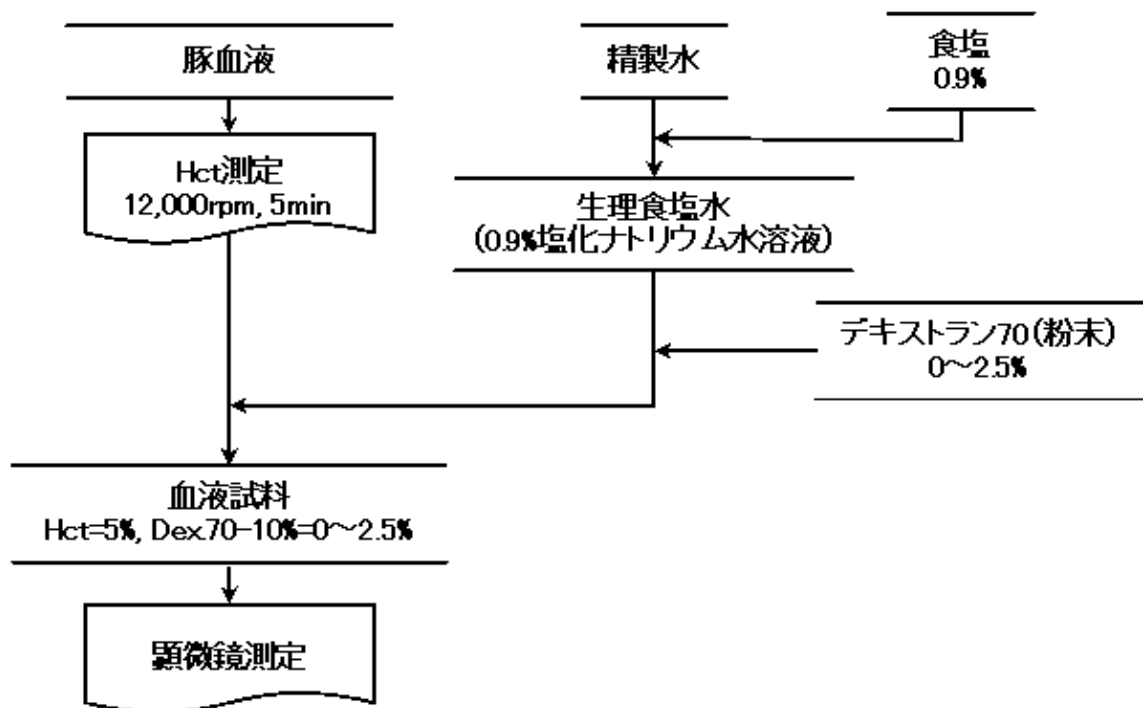


図 3.4 低濃度血液試料の調整手順

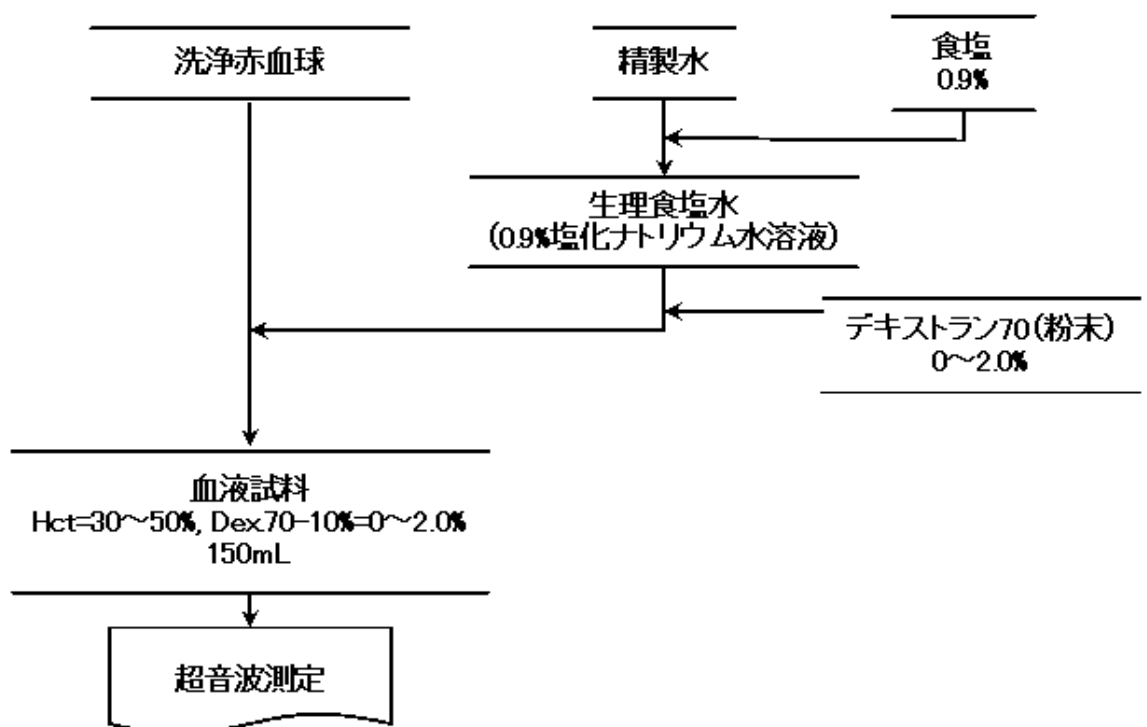


図 3.5 高濃度血液試料の調整手順

3.2. 顕微鏡観察による凝集度評価

赤血球およびアクリル粒子の凝集体は複雑な形状を持つことが顕微鏡観察によって確認されている。本研究では以下の図 3.6 のような方法で凝集体を楕円に近似しその短径と長径の平均を 1 つの凝集体の平均径とする。

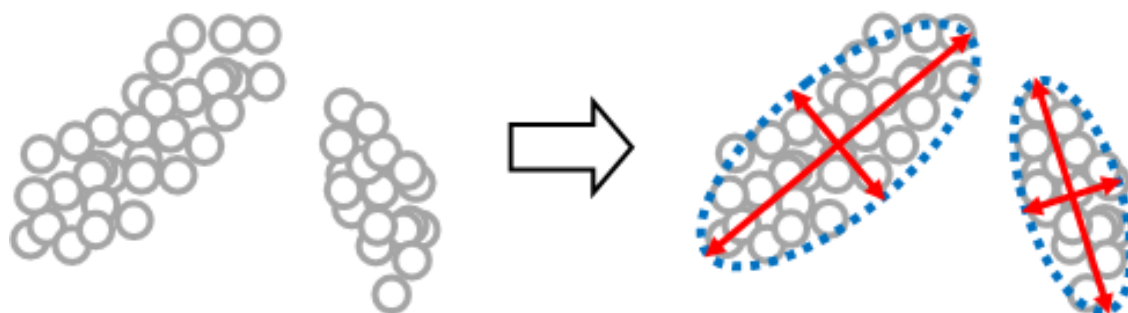


図 3.6 楕円による凝集体の近似および凝集径の決定

本研究ではアロンブロック C510 のアクリル粒子に対する凝集作用、デキストラン 70 の赤血球に対する凝集作用を確認するため、それぞれ粒子の質量濃度 5%、Hct=5%に調整したサンプルを用いて平均凝集径測定を行う。実際の血液の Hct は 40%前後であるが、高濃度の懸濁液においては光学顕微鏡を用いた測定の際粒子同士が奥行き方向に重なってしまうことや、粒子同士が密着していることによって個々の凝集体サイズの正確な測定が困難となる。そのため本研究では 5%の低濃度に調整したサンプルを用いてアロンブロック C510、デキストラン 70 それぞれの凝集作用を確認する。

溶液を超音波測定と同様の深さのあるバットなどに入れた状態では観察できないため、スライドガラスなどに薄く広げる必要がある。この際、凝集体は図 3.7 のように横に広がる方向に配向することが考えられ、光学的観察による測定結果が実際の平均の径より大きく見積もられる可能性がある。しかしながらこのような条件下においても凝集剤の混合比率によって平均の凝集径が増大し、それに応じた超音波ピーク周波数の特性を調査するという本研究の目的は達成することが可能である。

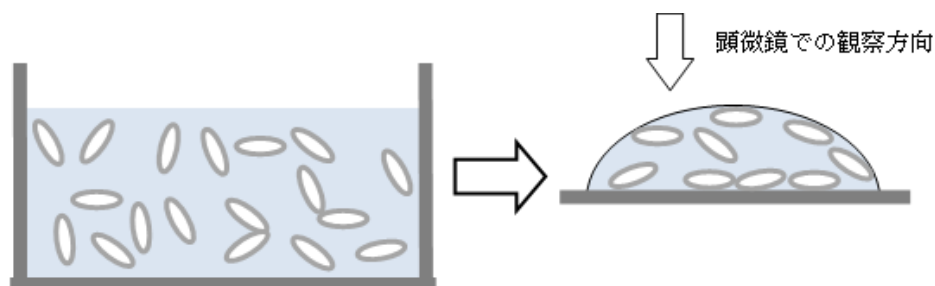


図 3.7 顕微鏡観察方向に対する凝集体の配傾

本研究では以下の表 3.2 の機器を用いて凝集径の測定を行う。300 以上の粒子・凝集体を室温 23℃で計測し、平均凝集径を求めた。

表 3.2 使用する機器

機器・ソフト名	製造社名	品名・型番・性能等
光学顕微鏡	KEYENCE	VHX-1000
Image J	National Institutes of Health	

3.3. 超音波ピーク周波数スペクトル測定

本研究では以下の図 3.8 のような実験機器構成で超音波ピーク周波数スペクトルを測定していく、

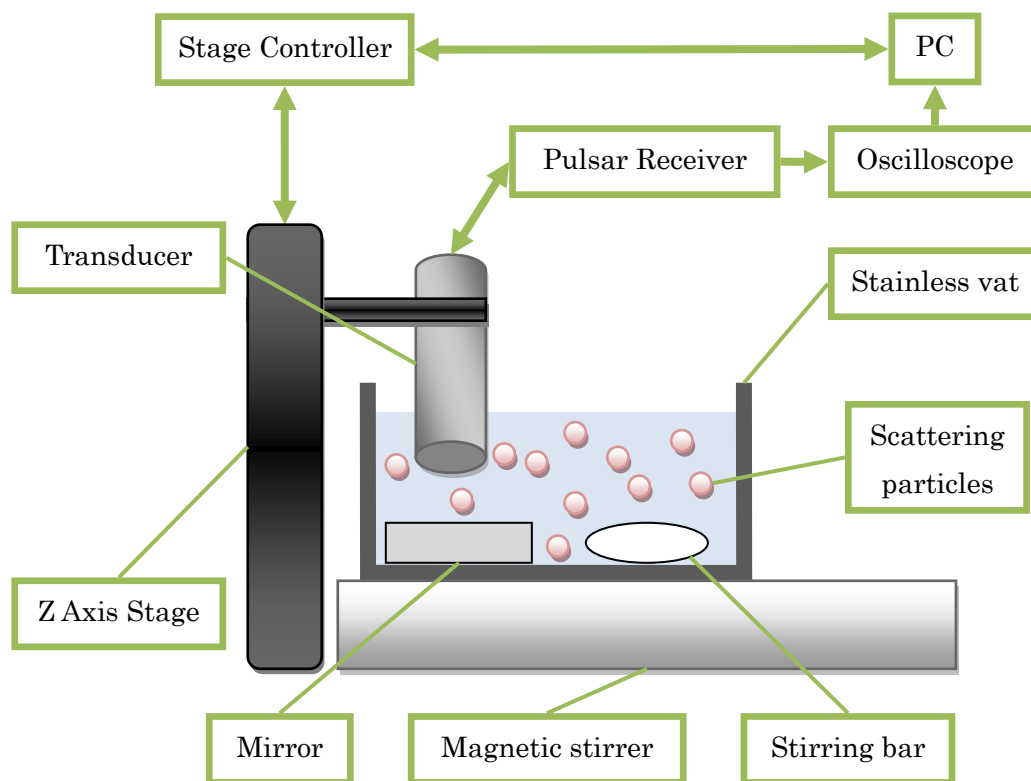


図 3.8 実験機器構成図

以上の実験システムで使用する実験機器は以下の表 3.3 のとおりである。

表 3.3 使用する実験機器

機器名	製造社名	品名・型番
トランスデューサ	Olympus	V-316-SU
オシロスコープ	Agilent Technologies	DSO1014A
パルサーレシーバ	OLYMPUS	5073PR
マグネチックスターラ	ASONE	HS-1DN
クールインキュベータ	MEE	CN-40A
自動ステージ	シグマ光機	SGSP20-20(X), SGSP20-20(Z)
2 軸ステージコントローラ	シグマ光機	SHOT-102
ステンレス製バット	赤川器物製作所	L105×W68×H59[mm], 0.3L
ラボラン回転子	ASONE	30×φ8, PTFE 製

以上のような測定系で測定試料に対して超音波測定を行う際、粒子・赤血球の凝集度以外にピーク周波数に影響を与えると考えられるパラメータは超音波の経路長、攪拌、粒子濃度の3つである。凝集度—ピーク周波数間の関係性を明らかにするため、まずこれらのパラメータのピーク周波数への影響を以下の実験を行うことで調査する。実験は 37℃に調整したクールインキュベータ CN-40A 内で行う。

3.3.1.超音波の経路長の影響

超音波が溶液に入射してから反射板で反射して受信するまでの距離、すなわち超音波の経路長が変化することによって超音波の経路中に含まれる粒子数が大きく変化する。本研究で測定するピーク周波数のシフトは超音波経路中の粒子による散乱に基づいているため、超音波の経路長はピーク周波数に大きく影響することが予想される。したがって本研究では以下のような実験を行うことによってこの影響を調査する。

本研究で構成した実験系ではトランスデューサを Z 軸ステージに固定しており、トランスデューサー反射板間の距離を任意に設定することができる。本研究では超音波の経路長をアクリル試料の場合は 2~20mm の範囲を 1.0mm 間隔で、血液試料の場合は 10mm~30mm の範囲を 1.0mm 間隔で変化させながら実験を行い、超音波の経路長のピーク周波数に与える影響を調査する。ここでは凝集径が最小になると考えられる凝集剤を投入しない血液試料と凝集径が最大になると考えられる凝集剤濃度で投入したアクリル試料・血液試料に対してピーク周波数測定を行い、超音波の経路長の適切な設定値を探索する実験を行う。

3.3.2.マグネチックスターラによる攪拌の影響

攪拌には以下の目的がある。

1 つ目は試料の作製段階において凝集剤溶液や粒子、赤血球と溶媒を均一に混合するためであり、アクリル粒子試料・血液試料いずれの場合においても試料作製段階で攪拌を行う必要がある。

2 つ目は超音波測定中に粒子および赤血球が沈降することを防ぐためである。アクリル粒子試料の場合、CMC によって溶媒の粘度を高めたとしても沈降を完全に防ぐことはできないため、攪拌を行うことが必要である。アクリル粒子の沈降を防ぐためには本研究の実験で用いたステンレス容器や回転子などの環境下では 360rpm 程度の攪拌が必要であった。また、アロンブロック C510 の凝集作用によるアクリル粒子の凝集現象はこの攪拌によって破壊されない強度を持つ。

対して、血液試料の場合、赤血球の比重が血漿や生理食塩水に近い場合、超音波測定の実験を行う間に起こる沈降は小さく攪拌を行うことは必須ではない。赤血球の沈降を完全に防ぐためには本研究の実験環境下で 300rpm 程度の攪拌が必要であったが、赤血球の凝集体は血液の流れや攪拌などで容易に破壊されることが知られている[15]。そのため本項では血

液試料に対して攪拌をした場合としない場合において行い、攪拌のピーク周波数に対する影響を調査する。

また 3.3.3. では攪拌を行わない場合、超音波測定に影響を与える赤血球の沈降が起こるかどうかを調査する。

このほかにも攪拌を行うことで溶液に流れが生まれるため、ドップラーシフトによるピーク周波数の変化が起こる可能性がある。しかしながら水中での音速が約 1500m/s であるのに対し、本研究で行う 300rpm 程度の攪拌で起こる流速は回転数と回転子のサイズから~500mm/s 程度であると考えられる。この予想される流速が水中での音速と比較して非常に小さいため本研究の実験環境下では攪拌によるドップラーシフトは考慮する必要がないと考えられる。

3.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響

3.3.1. 章の実験で超音波の経路長を変化させながら測定を行う場合、10mm と 40mm ではおよそ 60min の時間差が生じてしまう。この際、攪拌を行わないと前項で述べた赤血球の沈降、および凝集体形成の増進が起こる可能性がある。そのため攪拌しない場合において、時間経過に応じて超音波の経路長が大きくなる場合と時間経過に応じて超音波の経路長が小さくなる場合の双方において実験を行い比較することによって、赤血球の沈降および時間経過による赤血球凝集体形成の増進の影響を調査する。

アクリル粒子試料の場合は攪拌を行わないと、即座にアクリル粒子が沈降してしまい超音波測定を正確に行うことができないこと、およびアロンブロック C510 の凝集作用が強いためアクリル凝集体が攪拌で破壊されないことから本項の実験は行わない。

3.3.4. ヘマトクリットの影響

ヘマトクリットはヒトの場合健常者でも、男性 : Hct=40.8~49.6%, 女性 : Hct=34.0~45.3%と個体差のある値をとることが知られている[29]。Hct が変化することにより超音波の経路中に含まれる粒子数が変化するため、Hct もまたピーク周波数に影響を与えるパラメータであると予想される。本研究では Hct を 30,40,50%の 3 つの値に設定し、Hct のピーク周波数に与える影響を調査する。本項では Hct による影響を調査するためデキストラン 70 溶液は投入しない。

第4章. 結果

4.1. 顕微鏡観察による凝集度評価

4.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価

低濃度 6.5 $\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子+凝集剤による赤血球凝集体模擬試料に対して、光学顕微鏡を用いた凝集径の測定を行った。

アクリル粒子濃度 5%、アロンフロック 0.1%溶液濃度 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%における凝集径の測定結果を以下の図 4.1 に示す。

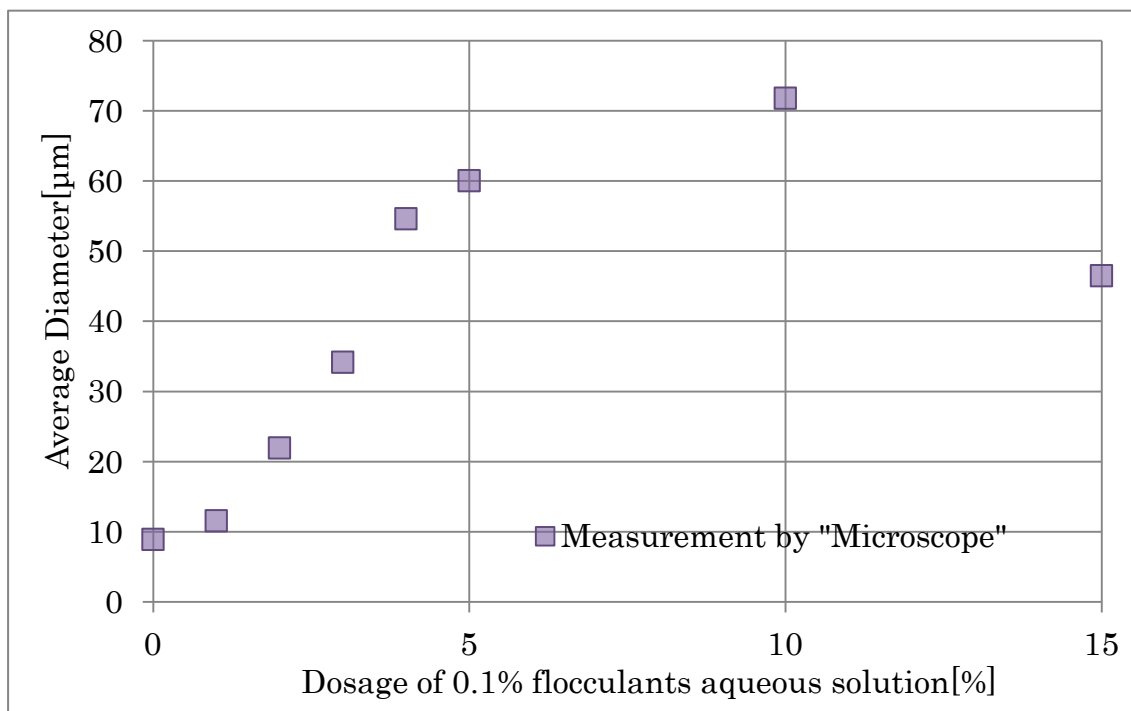


図 4.1 凝集剤 C510 投入によるアクリル凝集体平均径の変化

以上の結果から凝集剤濃度 10%まででは凝集剤の投入量によってアクリル凝集体の平均凝集径が大きくなり、10%よりも多く凝集剤を投入してもアクリル凝集体の平均凝集径はそれ以上大きくならないことが分かった。

4.1.2.低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価

低濃度血液試料に対して光学顕微鏡を用いた赤血球凝集径の測定を行った。

Hct=5.0%、デキストラン 70 濃度 1%, 1.5%, 2%, 2.5% の場合の凝集径の顕微鏡観察による測定結果を以下の図 4.2 に示す。

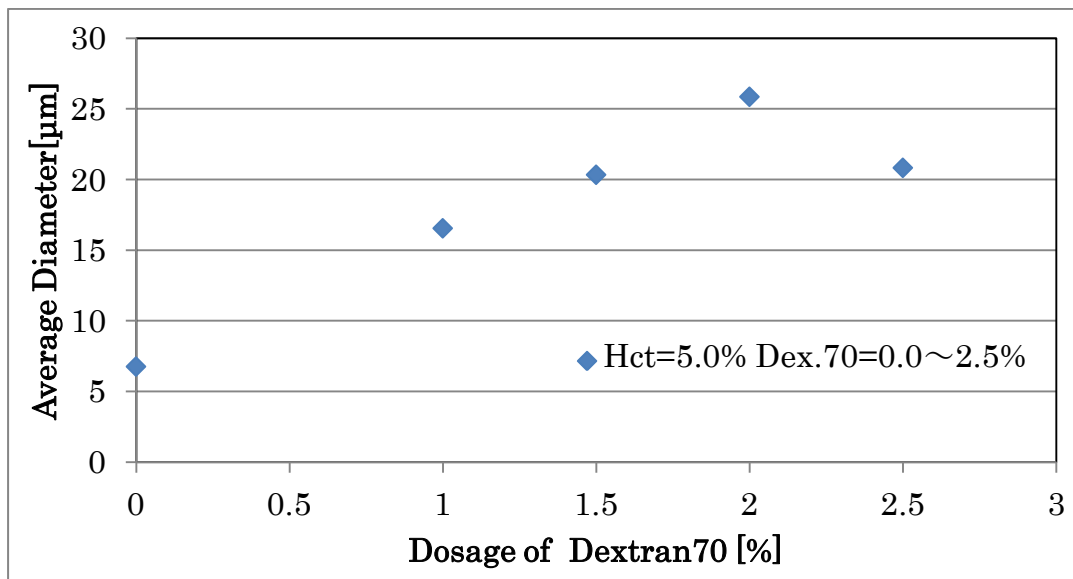


図 4.2 デキストラン 70 投入による赤血球凝集体平均径の変化

以上の結果からデキストラン 70 濃度が 2% までの場合はデキストランの投入量によって赤血球の平均凝集径が増加し、それ以降は赤血球の平均凝集径が低くなることが分かった。本研究では赤血球凝集度に応じたピーク周波数の特性を調査することが目的であるため、以降の実験はデキストラン 70 濃度が 2.0% までの範囲で行う。

4.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

4.2.1. 超音波の経路長の影響

CMC1.0%水溶液、および $6.5\mu\text{m}\phi$ アクリル粒子溶液に凝集剤アロンフロック C510-0.1%水溶液を 0,3,5,10,15%で投入した試料に対して、超音波の経路長を 2~20mm の範囲で変化させながら超音波ピーク周波数の測定を行った結果を以下の図 4.3 に示す。本項では超音波の経路長がピーク周波数に影響を与えることの確認、および大まかに適切な超音波の経路長を探索することが目的であるため、超音波の経路長の探索の間隔は適宜設定した。

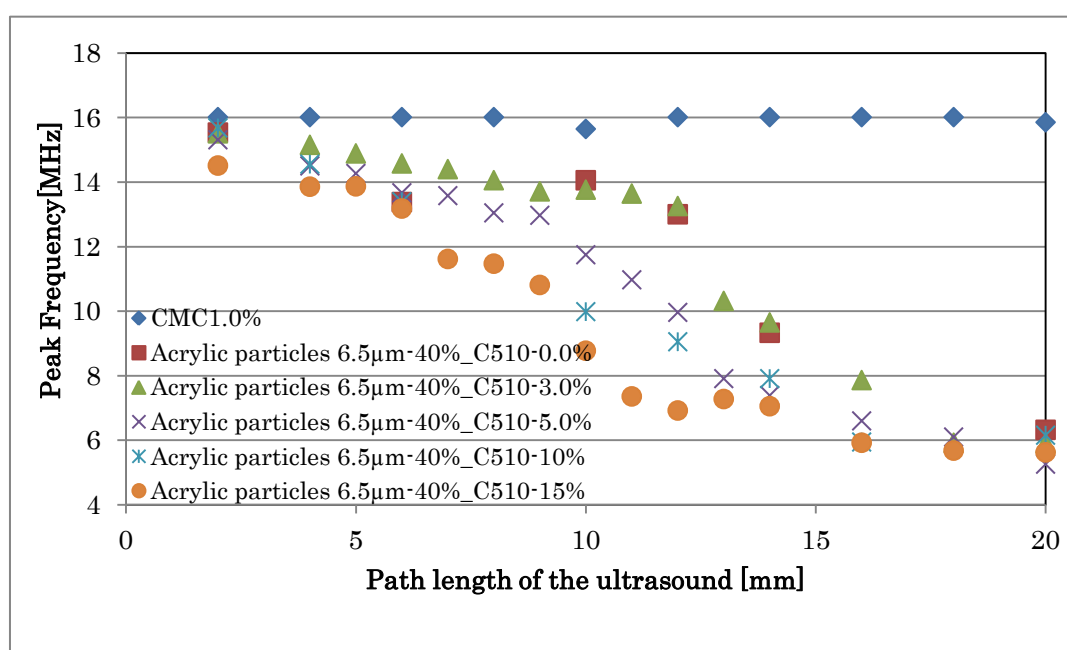


図 4.3 アクリル粒子懸濁液中でのピーク周波数測定における超音波経路長の影響

以上の結果から超音波の経路長が 6mm より小さい場合はいずれの試料でも差が得られなかった。また超音波の経路長が 16mm より大きい場合も試料による差が得られなかった。

また、この結果から C510-0.1%水溶液濃度が 0%の場合と 15%の場合でピーク周波数の差が最大となった超音波の経路長を 12mm とするのが本研究の実験系における超音波の経路長の適切な設定値であると考えられる。

4.2.2. アクリル粒子凝集度の影響

4.2.1. 項の実験結果より超音波の経路長を 12mm とした場合の C510-0.1%水溶液濃度とピーク周波数との関係を以下の図 4.4 に示す。

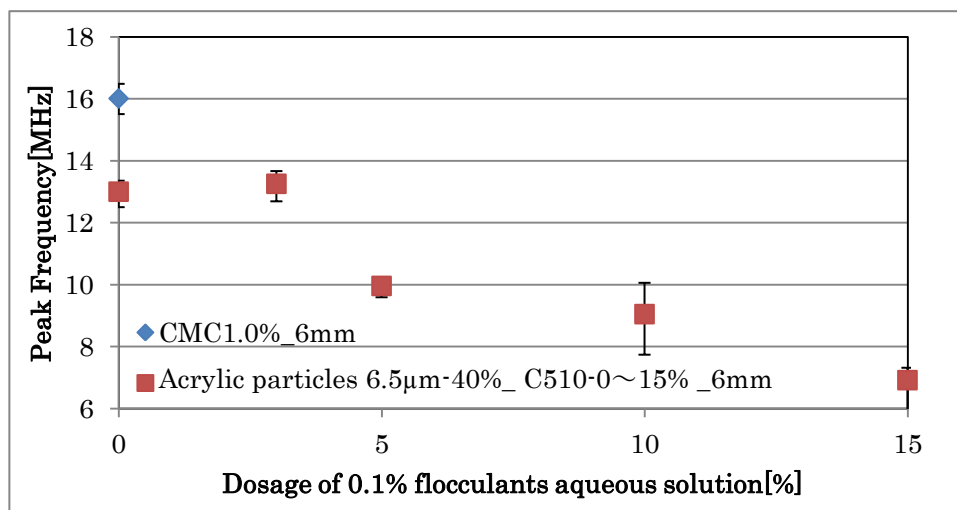


図 4.4 アクリル粒子懸濁液中での凝集剤投入量とピーク周波数の関係

また、4.1.1.項で測定した各 C510-0.1%水溶液濃度におけるアクリル凝集体の平均の凝集径とピーク周波数の関係を以下の図 4.5 に示す。

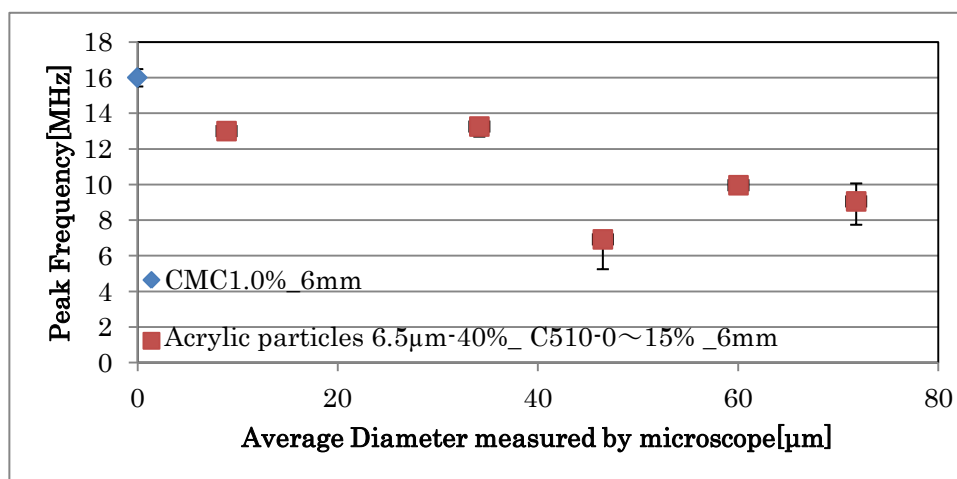


図 4.5 アクリル粒子懸濁液中での平均凝集径とピーク周波数の関係

これらの結果から高濃度アクリル懸濁液に対しても、ピーク周波数による凝集度測定の可能性が示された。

4.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

4.3.1. 超音波の経路長の影響

実験系の安定性や超音波ピーク周波数測定時に懸濁液の分散溶媒となる生理食塩水に対する特性を把握するため、生理食塩水に対して超音波の経路長を変化させながら超音波ピーク周波数の測定を行った。この結果を以下の図 4.6 に示す。

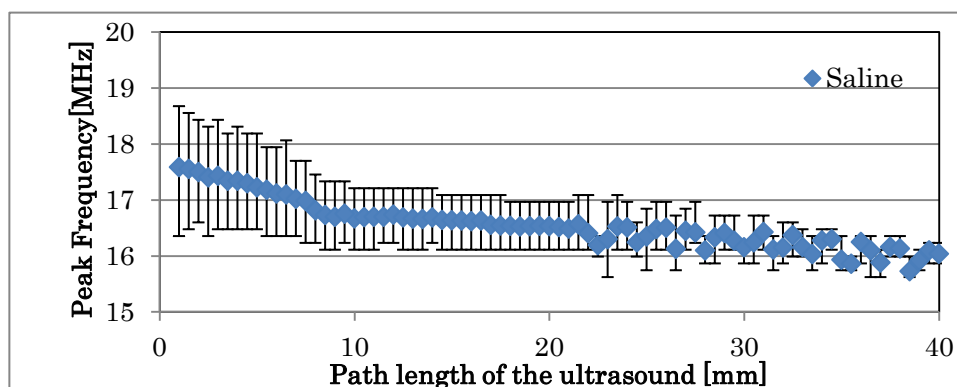


図 4.6 生理食塩水中でのピーク周波数測定における超音波経路長の影響

以上の結果から超音波の経路長が 10mm より小さい場合にピーク周波数が急激に変化していること、21mm よりも大きい範囲で測定結果の安定性が低くなることがわかる。この結果から以降行う血液サンプルに対する超音波測定は 10mm~20mm の範囲で行うのが適切であると考えられる。

以上の結果に Hct=40%, Dex70 濃度 0%、Hct=40%, Dex70 濃度 2.0%の血液試料に対するピーク周波数の測定結果を加えると以下の図 4.7 様になる。

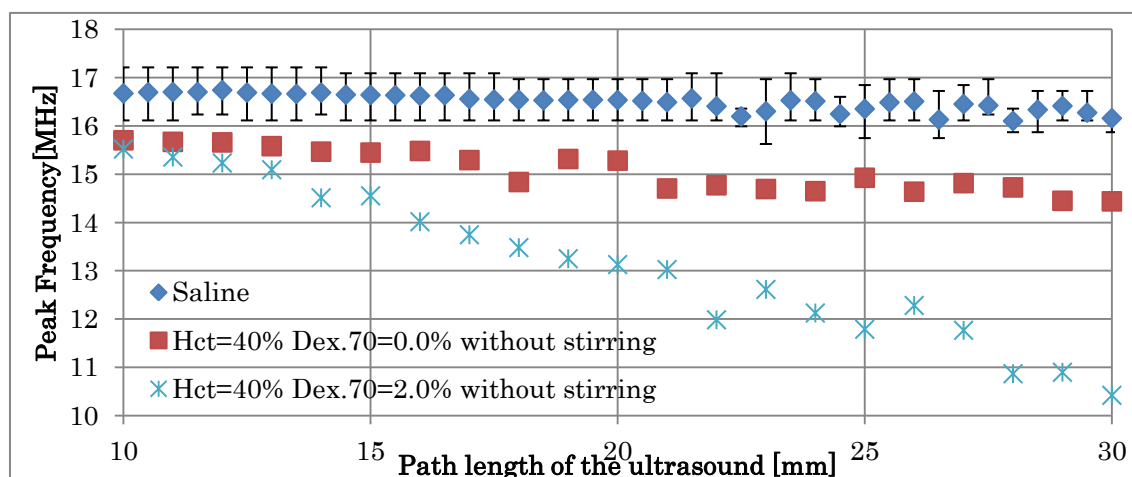


図 4.7 血液試料中でのピーク周波数測定における超音波経路長の影響

図 4.1 の生理食塩水に対する測定結果から超音波の経路長を 10mm~20mm の範囲に設定するのが適切であると考えられることから、Hct=40%, Dex70 濃度 0%の血液試料と Hct=40%, Dex70 濃度 2.0%の血液試料とのピーク周波数の差を 10mm~20mm の範囲で以下の図 4.8 に示す。

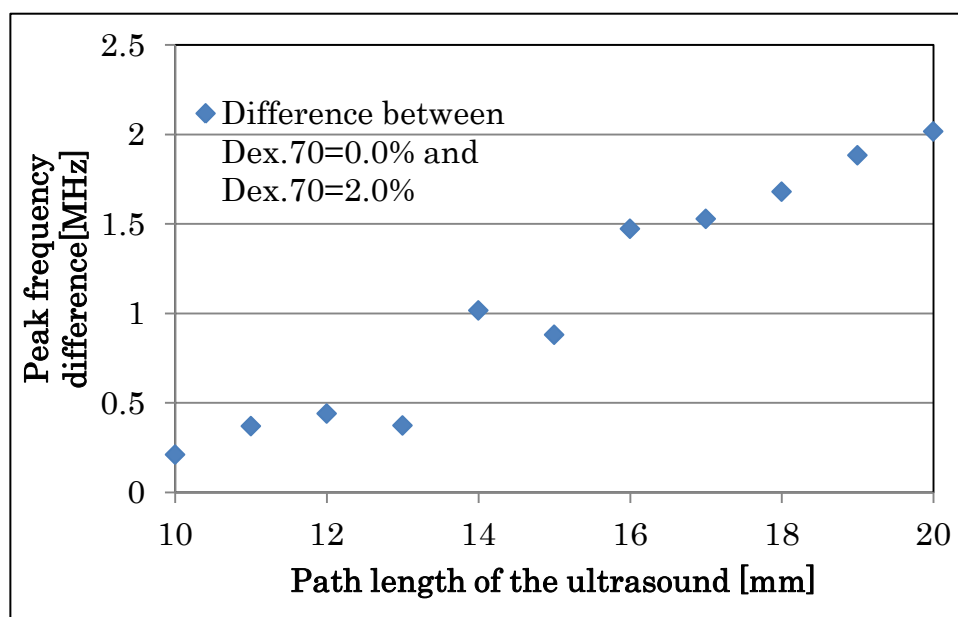


図 4.8 Dex70 濃度 0%および Dex70 濃度 2.0%の血液試料におけるピーク周波数の差異

この結果から、超音波の経路長を 20mm とすることによって最大のピーク周波数差を得ることができることが分かった。

4.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響

Hct=40%に調整した血液試料に Dex70-10%水溶液を Dex70 濃度が 1.0%,1.5%,2.0%となるように投入したサンプルにおいて、300rpm で攪拌した場合と攪拌を行わなかった場合の超音波経路長 10~30mm におけるピーク周波数の測定結果を以下の図 4.9、図 4.10、図 4.11 に示す。

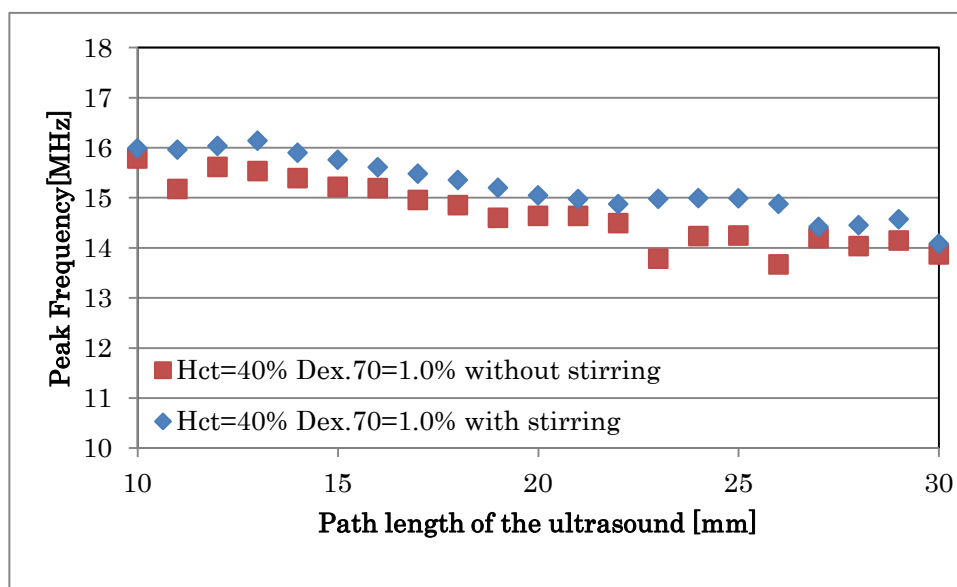


図 4.9 Hct=40%, Dex70=1.0%における攪拌の影響

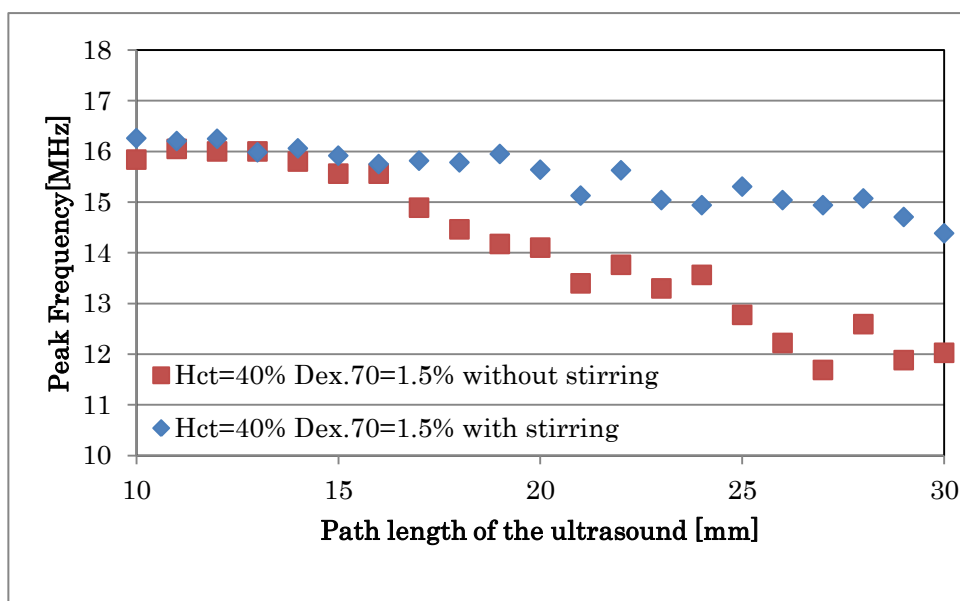


図 4.10 Hct=40%, Dex70=1.5%における攪拌の影響

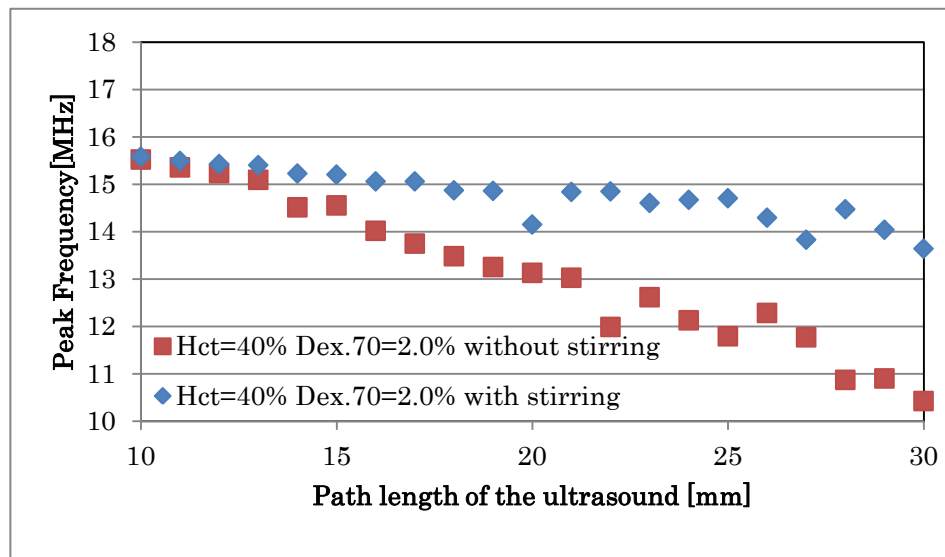


図 4.11 Hct=40%, Dex70=2.0%における攪拌の影響

Dex70 濃度 1.0%, 1.5%, 2.0%いずれの場合においても、攪拌しなかった場合より攪拌した場合のほうがピーク周波数が高かった。

ここで攪拌した場合の各結果と Dex70-10%水溶液を投入しない場合の測定結果とを比較した結果を以下の図 4.12 に示す。

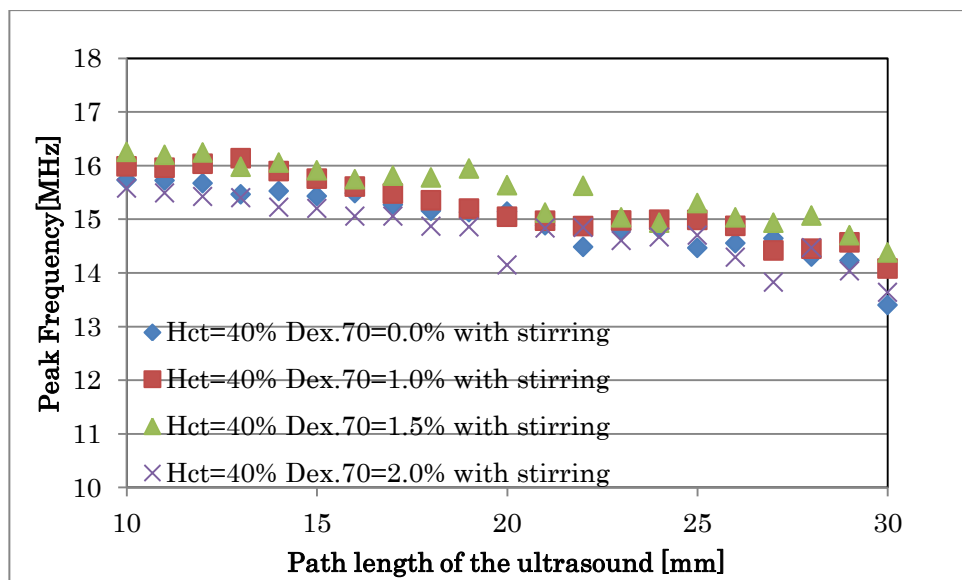


図 4.12 攪拌を行った場合の各 Dex70 濃度におけるピーク周波数の差異

この結果から 300rpm で攪拌を行い、Dex70 濃度を 1.0%, 1.5%, 2.0% で投入した場合のピーク周波数は Dex70 の水溶液を投入しない場合のピーク周波数と差がないことが分かる。

4.3.3. 時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響

Hct=40%, Dex70 濃度 1.0%に調整した血液サンプルに対して、攪拌を行わず超音波経路長を 10~30mm の範囲で変化させながら測定を行った。超音波経路長を 10→30mm と変化させた場合を順方向、超音波経路長を 30→10mm と変化させた場合を逆方向とし、以下の図 4.13 に示す。

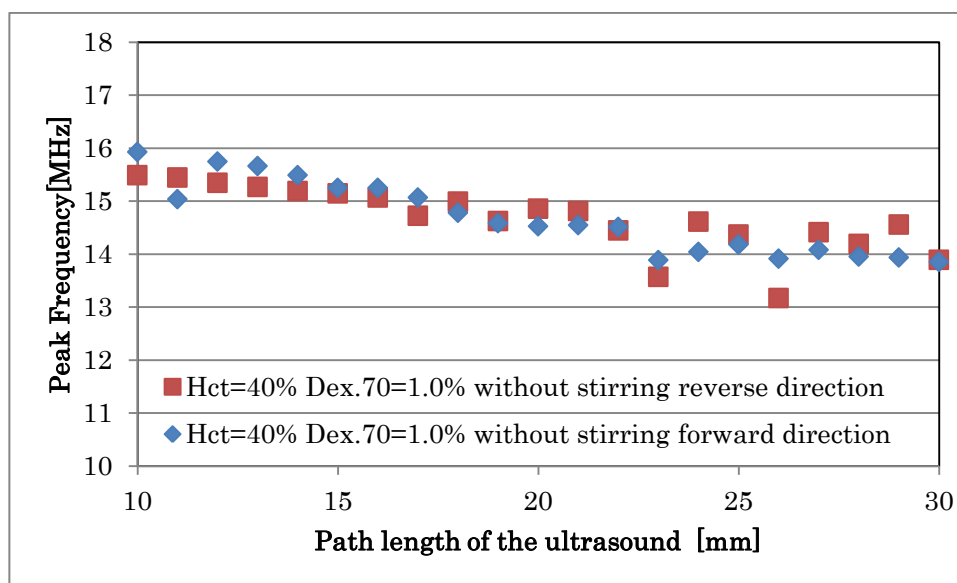


図 4.13 攪拌を行わない場合の時間経過による赤血球凝集の増進および赤血球の沈降の影響

超音波経路長を 10→30mm と変化させた場合、超音波経路長を 30→10mm と変化させた場合いずれの場合においても超音波経路長の増加に伴ってピーク周波数が低下したことがわかる。

4.3.4.ヘマトクリットの影響

Hct=30, 40, 50%に調整した血液サンプルに対して、超音波経路長を10~30mmの範囲で変化させながら測定を行った結果を以下の図4.14に示す。凝集剤は投入しないが、凝集剤を投入しない場合でも時間経過によって自然に凝集体が形成される可能性があるため、攪拌を行うことで凝集体の形成を防ぐ。

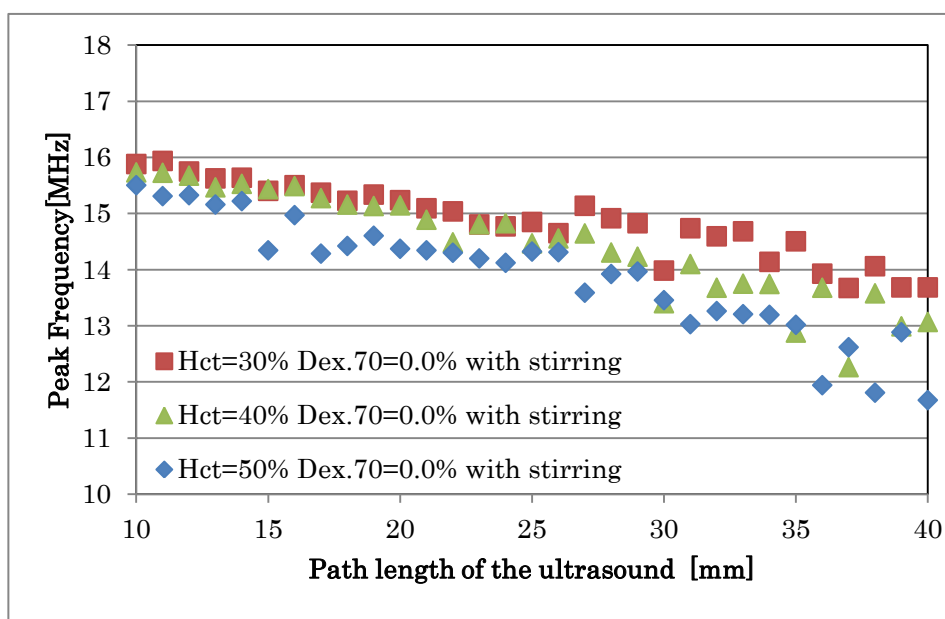


図 4.14 ピーク周波数測定におけるヘマトクリットの影響

以上のグラフから多くの超音波経路長において、ピーク周波数がHct=30%の場合> Hct=40%の場合> Hct=50%の場合となっていることが分かる。

4.3.5.赤血球凝集度の影響

Hct=40%, Dex70 濃度 0.0, 1.0, 1.5, 2.0%に調整した血液サンプルに対して、10~30mm の範囲で変化させながら測定を行った結果を図 4.15 に示す。4.2.2.項および 4.2.3.項の結果から凝集体の破壊を防ぐため攪拌を行わない。

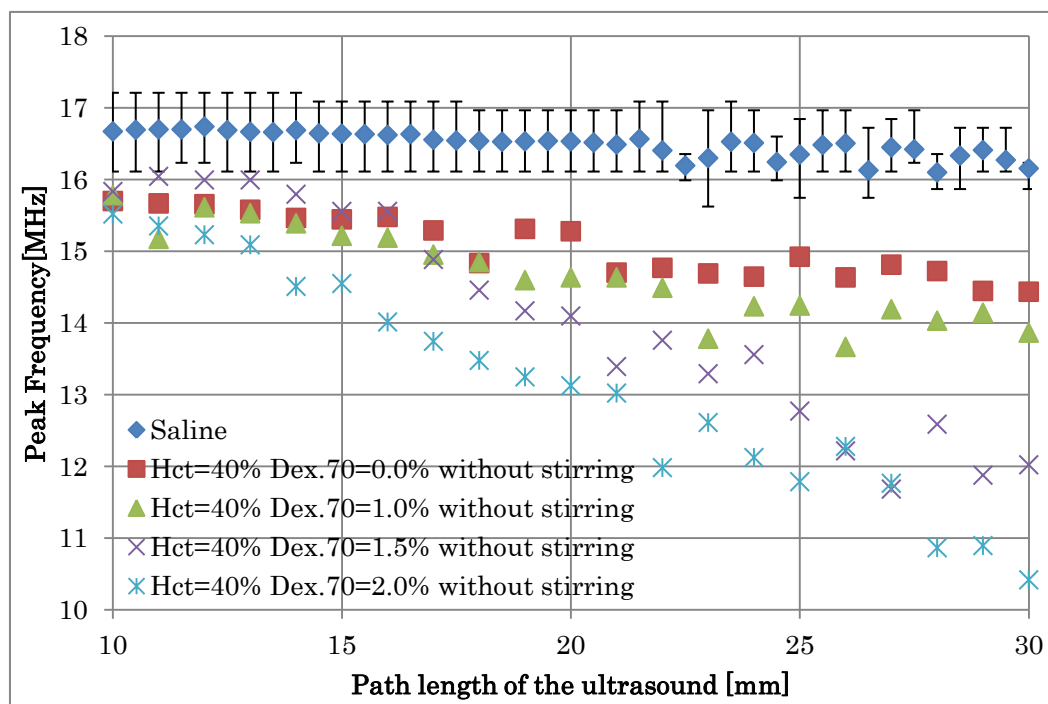


図 4.15 血液試料中でのピーク周波数測定における超音波経路長および Dex70 濃度の影響

4.2.1.項の結果から超音波の経路長が 20mm の場合が最も赤血球凝集度の測定に適していると考えられる。超音波の経路長が 20mm の場合のデキストラン濃度とピーク周波数の関係を以下の図 4.16 に示す。

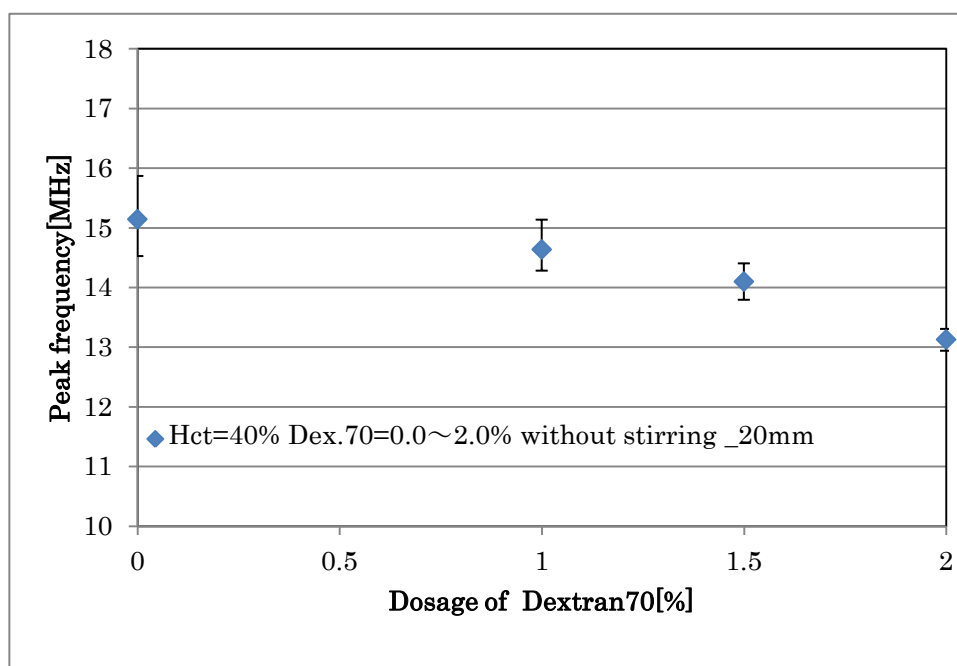


図 4.16 血液試料中での Dex70 投入量とピーク周波数の関係

以上の結果からデキストラン 70 の投入量によってピーク周波数が低下していることが示された。

第5章. 考察

5.1. 顕微鏡観察による凝集度評価

5.1.1. 低濃度小径アクリル粒子の凝集度評価

4.1.1.項の実験結果から、アロンフロック C510 の 0.1%水溶液によってアクリル粒子の凝集径を制御することが可能であることが示された。

5.1.2. 低濃度血液試料中の赤血球凝集度評価

4.1.2.項の実験結果から、デキストラン 70 によるによって赤血球の凝集径を制御することが可能であることが示された。

またこの実験結果は「ヒトおよびウマ血液におけるデキストランの凝集作用は濃度 2~3%で最大値をとり、それを超えると下降する」との知見と一致している[30]。

5.2. 高濃度アクリル試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

4.2.1.項 図 4.3 の実験結果では超音波の経路長が 3mm より小さい場合いずれの試料でも差が得られなかったが、これは超音波の経路中に含まれる粒子が少ないためであると考えられる。また超音波の経路長が 8mm より大きい場合もいずれの場合でも差が得られなかったが、これはいずれの試料でも超音波の経路中に含まれる多数の粒子によって超音波の高周波成分が減衰してしまったためであると考えられる。

4.2.1.項の実験結果より超音波の経路長がピーク周波数による懸濁液中の粒子凝集度測定において重要なパラメータであることが判明した。また、4.2.2.項の実験結果から超音波の経路長を適切に設定することで懸濁液中の粒子凝集度をピーク周波数測定によって測定することが可能であることが示された。

このアクリル凝集体懸濁液に対する実験の結果から、実際の血液に対する実験を行う際においても超音波の経路長を適切に設計する必要性が判明した。

5.3. 血液試料に対する超音波ピーク周波数スペクトル測定

5.3.1. 超音波の経路長の影響

高濃度アクリル凝集体懸濁液に対する実験の結果から超音波の経路長が重要なパラメータの一つであることが判明したため、血液試料に対しても同様の実験を行い適切な超音波の経路長の探索を行った。4.3.1.の結果から20mmが超音波の経路長の最適値であると判断したが、この結果は高濃度アクリル凝集体懸濁液に対する実験で得た超音波の経路長の最適値とは異なる値となった。これはアクリル粒子と赤血球の音響インピーダンスの違いや、アクリル粒子溶液作製の際アクリル粒子を質量濃度を用いて混合したことによりアクリル粒子の体積分率が質量濃度より小さくなったことが影響していると考えられる。

5.3.2. マグネチックスターラによる攪拌の影響

4.3.2.の図 4.12 の実験結果よりデキストランを投入しない場合のピーク周波数とデキストランを投入し攪拌を行った場合の各ピーク周波数間に差が現れなかったことから、デキストラン 70 を投入することによって形成された赤血球凝集体は攪拌によって破壊されてしまうと考えられる。このことから本研究で目的とする赤血球凝集度とピーク周波数の関係を調査するためには攪拌を行わず測定を行うのが適切であると考え、攪拌を行わないことにより生じる変化を確認するため 4.3.3.の実験を行った。

5.3.3. 時間経過による凝集の増進および粒子・赤血球の沈降の影響

4.3.3.の図 4.13 の実験結果において、超音波経路長を10→30mmと変化させた場合、図 4.13 のグラフの横軸に沿って時間が経過する。対して超音波経路長を30→10mmと変化させた場合、図 4.13 のグラフの横軸30mmの測定点が経過時間0sであり、10mmの測定点が最も時間が経過した点である。時間経過に応じて赤血球の沈降や凝集体形成の増進が起これ、これが超音波高周波成分の減衰に影響を与える場合、これらの測定結果のグラフの傾きは相反すると予想される。したがって図 4.13 の結果から、本研究の実験条件下では攪拌を行わない場合において、時間経過に応じた赤血球の沈降や凝集体形成の増進は観察されなかったと考えられる。

5.3.4.ヘマトクリットの影響

超音波の経路長が変化することによってピーク周波数に影響を与えるのは超音波の経路中に存在する粒子の数が増えるためであると考えられる。したがってヘマトクリットもまたピーク周波数に影響を与えるパラメータであると考えられる。

4.3.3.の実験結果によりヘマトクリットが高い方がピーク周波数が低くなることが分かり、ヘマトクリットもまたピーク周波数に影響を与えるパラメータであることが判明した。この結果から「低 Hct, 高凝集度」の場合と「高 Hct, 低凝集度」の場合において同じピーク周波数が得られる可能性があり、各ヘマトクリット、凝集度におけるピーク周波数の詳細な調査が今後の課題となる。

5.3.5.赤血球凝集度の影響

4.1.2.項の結果からデキストラン 70 の投入量によって平均の凝集径が大きくなっていることが示されており、4.3.4.の結果からデキストラン 70 の投入量によってピーク周波数が低下することが示された。これらの結果から赤血球の平均凝集径のピーク周波数による測定の可能性を示すことができた。

第6章. まとめ

本研究では血液代替試料および赤血球凝集度を調整した血液試料に対して超音波ピーク周波数測定を行い、超音波ピーク周波数による赤血球凝集度測定の可能性を示した。

今後の課題

本研究では超音波ピーク周波数と赤血球凝集度の関係を調査したが、今後の研究で血液粘度・赤血球凝集度、血液粘度・ピーク周波数間の関連性を調査することで、ピーク周波数による血液粘度推定の可能性を示す必要がある。また、本研究の 4.3.4.の結果から Hct もピーク周波数に影響を与えるパラメータであることが判明した。Hct は血液粘度に影響を与えるパラメータであることが知られており[15]、Hct の血液粘度・赤血球凝集度・ピーク周波数に対する影響をより詳細に調査する必要がある。

参考文献

- [1] S. H. Wang and K. K. Shung : “In vivo measurements of ultrasonic backscattering in blood” , IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Contr., Vol.48, pp.425-431 (2001)
- [2] G. Cloutier and K. K. Shung : “Study of red cell aggregation in pulsatile flow from ultrasonic doppler power measurements” , Biorheology, Vol.30, pp.443-461 (1993)
- [3] François T. H. Yua and G. Cloutier : “Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator” , J. Acoust. Soc. Am., Vol.122, pp.645-656 (2007)
- [4] K. H. Nam, D. G. Paeng, and M. J. Choi : “Ultrasonic backscatter from rat blood in aggregating media under in vitro rotational flow” , IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control., Vol.56, No.2, pp.270-279 (2009)
- [5] C. C. Huang : “Cyclic variations of high-frequency ultrasonic backscattering from blood under pulsatile flow” , IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Contr., Vol.56, pp.1677-1688 (2009)
- [6] N. Saitoh, H. Hasegawa, and H. Kanai : “Estimation of Scatterer Diameter Using Ultrasonic Backscattering Property for Assessment of Red Blood Cell Aggregation” , Jpn. J. Appl. Phys., Vol.48, 07GJ08 (2009)
- [7] T. Fukushima, H. Hasegawa, and H. Kanai : “Estimation of Scatterer Diameter by Normalized Power Spectrum of High-Frequency Ultrasonic RF Echo for Assessment of Red Blood Cell Aggregation” , Jpn. J. Appl. Phys., Vol.50, 07HF02 (2011)
- [8] T.Sato, H.Tojo, and Y.Watanabe : “Highly Sensitive Detection of Red Blood Cell Aggregation with Ultrasonic Peak Frequency” , Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 52 no. 7, 07HF18-07HF18-6 (2013)
- [9] 有馬正浩, 佐藤隆幸, 渡部泰明: “超音波スペクトロスコピー法における小粒子凝集体と代替大粒子の実験的補正法” , 電気学会論文誌C分冊, Vol. 134, No. 1, pp.28-34 (2014)
- [10] 佐藤 隆幸, 須永 涼, 山岸 直生: “画像相関法に基づいた体外循環時の赤血球凝集度評価方法に関する検討” , 電気学会論文誌C分冊, Vol. 136, No. 10, pp.1437-1444 (2016)
- [11] Nobutaka Saitoh, Hideyuki Hasegawa, Hiroshi Kanai: “Assessment of red blood cell aggregation using normalized power spectrum of high frequency ultrasound”, 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings, pp.1975-1978(2008)

- [12] Franceschini, E. ; Lab. of Mech. & Acoust., LMA, CNRS, Marseille, France ; Yu, F.T.H. ; Destrempes, F. ; Cloutier, G., “In vivo ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the Structure Factor Size and Attenuation Estimator”, Ultrasonics Symposium (IUS), 2009 IEEE International, (2009)
- [13] Nobutaka Saitoh, Hideyuki Hasegawa, and Hiroshi Kanai, “Estimation of Scatterer Diameter Using Ultrasonic Backscattering Property for Assessment of Red Blood Cell Aggregation”, Japanese Journal of Applied Physics, Volume 48, Number 7S, (2009)
- [14] Hirofumi Taki, Kousuke Taki, Makoto Yamakawa, Tsuyoshi Shiina, Motoi Kudo, and Toru Sato, “High-range-resolution imaging using frequency domain interferometry with stabilization techniques for real-time vascular ultrasound”, Japanese Journal of Applied Physics, Volume 54, Number 7S1, (2011)
- [15] Oguz K. Baskurt, M.D., Ph.D., Herbert J. Meiselman, Sc.D., “Blood Rheology and Hemodynamics” The Hyperviscosity Syndromes; Editor in Chief, Eberhard F. Mammen, M.D.; Guest Editor, Hau C. Kwaan, M.D., Ph.D. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, volume 29, number 5, (2003).
- [16] G. D. O. Lowe, J. M. Lowe, M. M. Drummond, S. Reith, J. J. F. Belch, C. M. Kesson, A. Wylie, W. S. Foulds, C. D. Forbes, A. C. MacCuish, and W. G. Manderson : “Blood viscosity in young male diabetics with and without retinopathy” , Diabetologia, Vol.18, No.5, pp.359-363 (1980)
- [17] M. Melli, M. Poggi, L. Codeluppi, P. Baraldi, F. Torlai, and M. Peduzzi : “Blood viscosity and erythrocyte deformability in diabetic retinopathy”, Diabetologia, Vol.13, No.3, pp.371-374 (1983)
- [18] S. M. MacRury, M. Small, A. C. MacCuish, and C. D. Lowe : “Association of hypertension with blood viscosity in diabetes”, Diabetic Med., Vol.5, No.9, pp.830-834 (1988)
- [19] E. Franceschini, B. Metzger, and G. Cloutier : “Forward Problem Study of an Effective Medium Model for Ultrasound Blood Characterization”, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control, Vol.58, No.12 (1992)
- [18] 川口春馬: “有機分散系の分散・凝集技術” , 株式会社シーエムシー出版, pp.70-72 (2008)
- [21] A.S.Dukfin and P.J.Goetz: “Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change”, John Wiley and Sons (2006)

- [22] A.S.Dukfin and P.J.Goetz: “Ultrasound for Characterizing Colloids”, Elsevier (2002)
- [23] Shlomo Berliner, Ronen Ben-Ami, Dorit Samocha-Bonet, Subchi Abu-Abeid, Vered Schechner, Yitzhak Beigel, Itzhak Shapira, Saul Yedgar, Gershon Barshtein, “The degree of red blood cell aggregation on peripheral blood glass slides corresponds to inter-erythrocyte cohesive forces in laminar flow”, *Thrombosis Research*, Vol 114, Issue 1, pp.37–44 (2004)
- [24] Richard K. Johnson, “Sound scattering from a fluid sphere revisited”, *Acoustical Society of America, J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 61, No. 2, pp.375-377 (1977)
- [25] Masahiro Yamanari, Yoshiaki Yasuno, Toyohiko Yatagai, and Masahide Itoh “Analysis of the Polarization Dependence of Multiple Backscattering Light from Red Blood Cell Suspensions”, *光学* 34(2), 90-96, 応用物理学会分科会日本光学会 (2005)
- [26] 岡小天, : “バイオレオロジー(改訂改題)”, 物理化学選書7, 今井功, 小谷正雄, 森野米三, 永田武, 高橋秀俊 編集, 東京裳華房, (1984).
- [27] H. Bäumlér, B. Neu, E. Donath, H. Kieseewetter : “Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation”, *Biorheology* 36 (1999) 439-442 IOS Press (1999).
- [28] 内村功, : “〈フィブリノーゲン〉”, 日本バイオレオロジー学会誌Vol. 2 (1988) No. 3 p. 39, (1988).
- [29] 奈良 信雄, “特集これだけは知っておきたい検査のポイント第8集”, *medicina* 47巻 11号 pp. 56-59, 赤血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリット, 赤血球指数, 網赤血球, (2010)
- [30] Oguz K. Baskurt, Robert A. Farley, and Herbert J. Meiselman: “Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study”, *Am. J. Physiol. - Heart and Circul. Physiol.*, Vol. 273, No. 6, pp. H2604-H2612 (1997)

謝辞

本研究を進めるにあたり, 様々なご指導を頂きました佐藤隆幸助教に厚く御礼申し上げます。またお世話になりました研究室の皆様に深謝致します。